

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**Nanopartículas magnéticas como sistema de
liberación localizada de interferón- γ para
inmunoterapia antitumoral.**

Memoria presentada por

RAQUEL MEJÍAS LAGUNA

Madrid, 2011

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el
Departamento de **Inmunología y Oncología** del
Centro Nacional de Biotecnología,
bajo la dirección del
Dr. Domingo F. Barber Castaño.

If only it were all so simple: If only there were evil people somewhere insidiously committing evil deeds, and it were necessary only to separate them from the rest of us and destroy them. But the line dividing good and evil cuts through the heart of every human being, and who is willing to destroy a piece of his own heart?.

Aleksandr Solzhenitsyn

It is by no means inconceivable that small accumulations of tumor cells may develop and because of their possession of new antigenic potentialities provide an effective immunological reaction with regression of this tumor and no clinical hint of its existence.

Macfarlane Burnet

There is an universal requirement of multicellular organisms to preserve uniformity of cell type and to prevent mutant cells from colonizing and flourishing. Perhaps, in short, the phenomenon of homograft rejection will turn out to represent a primary mechanism for natural defence against neoplasia.

Lewis Thomas



Índice



17	Abreviaturas.
25	Summary.
31	Introducción.
31	1. Sistema inmune y cáncer.
31	1.1. La hipótesis de la inmunovigilancia.
33	1.2. Inmunoección tumoral.
39	1.3. Papel de los distintos componentes del sistema inmune en el desarrollo y eliminación de tumores.
43	1.4. Importancia del IFN- γ en la respuesta inmune antitumoral.
48	2. Utilización de citoquinas en inmunoterapia antitumoral.
48	2.1. Sistemas de distribución/liberación de citoquinas en inmunoterapia.
50	3. Sistemas de distribución de fármacos basados en nanopartículas.
51	3.1. Factores que influyen en la eficacia de los sistemas de distribución de fármacos basados en el uso de nanopartículas.
52	3.2. Utilización de nanopartículas en terapia tumoral.
53	3.3. Nanopartículas magnéticas.
55	4. Nanopartículas magnéticas como sistemas de distribución de fármacos antitumorales.
55	5. Modelos murinos de cáncer para experimentación.
61	Objetivos.
67	Materiales y métodos.
83	Resultados.
83	1. Interacción ente el IFN-γ y las nanopartículas magnéticas.
93	2. Internalización y citotoxicidad de las nanopartículas magnéticas cubiertas de DMSA en células Pan02 <i>in vitro</i>.



99	3. Biodistribución y toxicidad de las nanopartículas magnéticas cubiertas de DMSA <i>in vivo</i>.
108	4. Eficacia del sistema de distribución localizada de IFN-γ en modelos murinos de cáncer.
129	Discusión.
143	Conclusiones.
149	Bibliografía.
179	Anexo I – Fundamentos de magnetismo y nanopartículas magnéticas.
179	1. Magnetismo y comportamiento magnético.
183	2. Métodos de síntesis y estabilización de nanopartículas magnéticas.
187	3. Caracterización estructural y coloidal de las nanopartículas magnéticas.
195	Anexo II.
235	Agradecimientos.

*Todo cabe en lo breve. Pequeño es el niño y encierra al hombre;
estrecho es el cerebro y cobija el pensamiento; no es el ojo más que
un punto y abarca leguas.*

Alejandro Dumas



Abreviaturas



AC	Corriente alterna
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CD3	Cúmulo (<i>cluster</i>) de diferenciación-3
CD4	Cúmulo (<i>cluster</i>) de diferenciación-4
CD8	Cúmulo (<i>cluster</i>) de diferenciación-8
CD25	Cúmulo (<i>cluster</i>) de diferenciación-25
CD31	Cúmulo (<i>cluster</i>) de diferenciación-31
CD40	Cúmulo (<i>cluster</i>) de diferenciación-40
CDEX	Carboxidextrano
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CIT	Citrato
D.E.	Desviación estándar
DEX	Dextrano
DLS	Dispersión dinámica de luz (<i>dynamic light scattering</i>)
DMBA	Dimetilbenzantraceno
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
DMSA-NP	Nanopartículas cubiertas de DMSA
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
EPR	Permeabilidad y retención aumentada (<i>enhanced permeability and retention</i>)
FADH	Flavín Adenín dinucleótido
FBS	Suero fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>fibroblast growth factor</i>)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GM1	Monosialotetrahexosil gangliosido
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>)
HRP	Peroxidasa (<i>Horseradish peroxidase</i>)
ICAM	Molécula de adhesión intercelular (<i>inter-cellular adhesion molecule</i>)
IFN- α	Interferón-alfa
IFN- β	Interferón-beta
IFN- γ	Interferón-gamma
IFN- γ -DMSA-NP	IFN- γ adsorbido a nanopartículas cubiertas de DMSA



ABREVIATURAS

IFNGR	Receptor de IFN- γ
IL-2	Interleuquina-2
IL-4	Interleuquina-4
IL-5	Interleuquina-5
IL-6	Interleuquina-6
IL-10	Interleuquina-10
IL-12	Interleuquina-12
IL-13	Interleuquina-13
IL-15	Interleuquina-15
IL-21	Interleuquina-21
IL-23	Interleuquina-23
IL-27	Interleuquina-27
IP-10	Proteína inducida por interferón-10
IRF	Factor regulador de interferón (<i>interferon regulatory factor</i>)
I-TAC	Quimioatrayente-alfa de células T inducido por interferón (<i>interferon-inducible T cell α-chemoattractant</i>)
I.V.	Intravenoso
JAK	Janus quinasa
LAMP	Proteína de membrana asociada al lisosoma (<i>lysosomal-associated membrane protein</i>)
LMP	Proteína de membrana latente (<i>latent membrane protein</i>)
MCA	Metilcolantreno
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
MICA	Cadena A relacionada con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (<i>MHC class I-related chain A</i>)
MICB	Cadena B relacionada con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (<i>MHC class I-related chain B</i>)
MIG	Monoquina inducida por interferón-gamma (<i>monokine induced by IFN-γ</i>)
MR	Resonancia magnética
MTT	Bromuro de dimetiltiazol-difeniltetrazolio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NDEX	Aminodextrano
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Células <i>Natural Killer T</i>



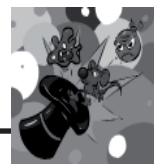
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PPA	Ácido fosfonoacético
RAG	Gen de activación de la recombinación (<i>recombination-activating gene</i>)
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Temperatura ambiente
S.C.	Subcutáneo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS
SQUID	<i>Superconducting quantum interferente device</i>
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TAP	Transportador de péptidos antigénicos (<i>antigen peptide transporter</i>)
TBS	Tampón Tris salino
Tc	Célula T citotóxica
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante-beta (<i>transforming growth factor-β</i>)
Th	Célula T <i>helper</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
TPA	Tetradecanoilforbol acetato
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>)
Treg	Célula T reguladora
TRITC	Tetrametilrodamina isotiocianato
U.A.	Unidades arbitrarias
VCAM	Molécula de adhesión vascular (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (<i>vascular endothelium growth factor</i>)
WB	<i>Western blot</i>

Estoy contento de estar aquí, porque el trabajo que dejé de realizar no cuenta, y los trabajos que realizaré después de esto serán mucho mejores... Cada uno tiene su manera de aprender.

Paulo Coelho



Summary



Classical treatment of cancer is based on surgery, radiotherapy and chemotherapy. These procedures affect both tumor and healthy tissue, which has led to the search for new therapies to fight tumors more specifically. Tumor immunotherapy shows promise as a cancer treatment strategy, as it should enhance the natural capacity of the immune system to scan for and eradicate tumor cells, a mechanism known as immunosurveillance. The immune response depends on the balance of cytokines produced by two T helper (Th) cells subsets, Th1 and Th2. The type 1 response, regulated by cytokines such interleukin-12 (IL-12) and interferon-gamma (IFN- γ) is the most effective against tumors and it is essential for *in vivo* eradication of tumors. IFN- γ plays a critical role in tumor immunosurveillance, by promoting activation and infiltration of immune effector cells, by increasing the immunogenicity of tumor cells, and by inhibiting tumor angiogenesis. Modulation of the immune response by administration of cytokines is one of the strategies used in cancer immunotherapy, but it is difficult to achieve a relevant therapeutic dosage at the tumor site without generating excessive toxicity to other tissues. Nanotechnology provides useful tools to target drugs in a controlled manner, using nanodevices. We propose to use magnetic nanoparticles, which can be guided to the site of action by the application of external magnetic gradients, as an IFN- γ delivery system for cancer immunotherapy.

In this work we have studied the adsorption of murine IFN- γ onto iron oxide magnetic nanoparticles, and analyzed the parameters that affect this interaction. We have tested cytotoxicity and biodistribution of the magnetic nanoparticles *in vitro* on Pan02 cells, and *in vivo* in C57BL/6 mice. Finally, we have tested small, uniform dimercaptosuccinic acid (DMSA)-coated monodisperse magnetic nanoparticles as a delivery system for IFN- γ in mouse models of cancer. IFN- γ -loaded magnetic nanoparticles were guided to the tumor site by applying an external magnetic field, and we analyzed the efficiency of nanoparticle accumulation, IFN- γ release in the area of interest, and their effects on tumor development. At the tumor site we observed nanoparticle accumulation and higher IFN- γ levels, which lead to increased immune effector cell infiltration, an anti-angiogenic effect and tumor regression. These findings indicate that DMSA-coated nanoparticles can be used as an efficient *in vivo* drug delivery system.

At the nanoscale there is no difference between Chemistry and Physics, Engineering, Mathematics, Biology or any subset thereof.

Mario Ferrari

Todas las ciencias están relacionadas entre sí, como las partes de un todo. Las unas prestan ayuda a las otras.

Francis Bacon



Introducción



1. Sistema inmune y cáncer.

Una de las funciones fisiológicas del **sistema inmune** es reconocer y eliminar las **células transformadas** que surgen en el organismo antes de que se manifiesten clínicamente. Esta idea fue propuesta por primera vez a principios del siglo XX por Paul Ehrlich, que defendía que, de forma espontánea, en todos los organismos complejos surgirían **células tumorales** con gran frecuencia, y que el **sistema inmune** sería capaz de eliminarlas. Esta idea se vio apoyada por los estudios de William B. Coley, que observó que en algunos pacientes de **cáncer** que sufrieron infecciones bacterianas se produjo también una regresión tumoral (Bickels et al., 2002). Sin embargo no fue hasta mediados de siglo cuando se retomó esta idea, y se demostró el papel de ciertos componentes celulares del **sistema inmune** en el rechazo de **alotransplantes**. El desarrollo de **cepas singénicas** de ratones permitió estudiar la **respuesta inmune** frente a **tumores** y distinguirla del rechazo inmunológico de tejidos transplantados y demostró la existencia de **antígenos tumorales específicos**. Estos estudios llevaron al establecimiento de la hipótesis de la **inmunovigilancia** o **vigilancia inmunitaria**.

1.1 La hipótesis de la Inmunovigilancia.

La hipótesis de la **inmunovigilancia** fue establecida por Burnet y Thomas, en los años 60. Burnet sostenía que debían existir **neoantígenos** específicos de **células tumorales** que podrían inducir una **respuesta inmunológica** efectiva que eliminaría los tumores en desarrollo, mientras que Thomas defendía que los organismos complejos debían poseer mecanismos para protegerse frente al desarrollo de **enfermedades neoplásicas**, y que estos mecanismos serían similares a los que median las reacciones de rechazo en transplantes (revisado en Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004). Sólo recientemente, con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética y de cepas de ratones transgénicos, se han obtenido claras evidencias, utilizando ratones deficientes en alguno de los componentes del **sistema inmune** o anticuerpos capaces de bloquear las funciones de estos componentes. Estos ratones muestran inequívocamente mayores incidencias de desarrollo de tumores. Por otra parte la administración de **estimuladores del sistema inmune** como α -galactosilceramida (Hayakawa et al., 2003), OK-432 (Homma et al., 2007), partículas virales inactivadas (Kurooka y Kaneda, 2007) o ARN de doble cadena (Whitmore et al., 2004) **reducen la incidencia** de tumores o producen la **regresión** de tumores establecidos en ratones **inmunocompetentes**.

Existen varias evidencias de que la **inmunovigilancia** juega un importante papel en la supresión de tumores también en humanos (Zitvogel et al., 2006). Se ha observado que los pacientes que reciben un trasplante y que están en tratamiento con **inmunosupresores**, o los pacientes que padecen **inmunodeficiencias primarias**, presentan un riesgo mayor de desarrollar tumores



INTRODUCCIÓN

(Dantal y Soullillou, 2005; Gatti y Good, 1971; Serraino et al., 2007), lo que sugiere que el **sistema inmune** es necesario para controlar el desarrollo de tumores en humanos. Siendo así, es de esperar que los pacientes con **lesiones premalignas o cáncer** en sus primeras fases sean capaces de desarrollar una **respuesta inmune** contra el tipo de tumor que padecen, como de hecho sucede. Por ejemplo, los pacientes con gammopatías monoclonales, que son afecciones premalignas, generan potentes respuestas basadas en la activación de **células T** contra las **células B** alteradas (Dhodapkar et al., 2003). En la médula ósea de pacientes con cáncer de mama pueden encontrarse células **T CD8⁺** que reconocen específicamente péptidos derivados de proteínas asociadas a este tipo de cáncer, y estas **células T** median la regresión de este tipo de tumores al ser transplantados en ratones **inmunodeficientes** (Beckhove et al., 2004). Se han descrito resultados similares a estos en pacientes con cáncer pancreático (Schmitz-Winnenthal et al., 2005) o renal (Dörtschuck et al., 2004). Además, la infiltración de **células inmunes efectoras** suele ser un signo de buen pronóstico en diversos tipos de tumores como glioblastomas (Ueda et al., 2007; Yang et al., 2010), cáncer de ovario (Leffers et al., 2009), hepático (Li, 2009; Fatourou y Koskinas, 2009), melanomas (van Houdt et al., 2008) y cáncer de colon (Forsell et al., 2007).

Figura I.1

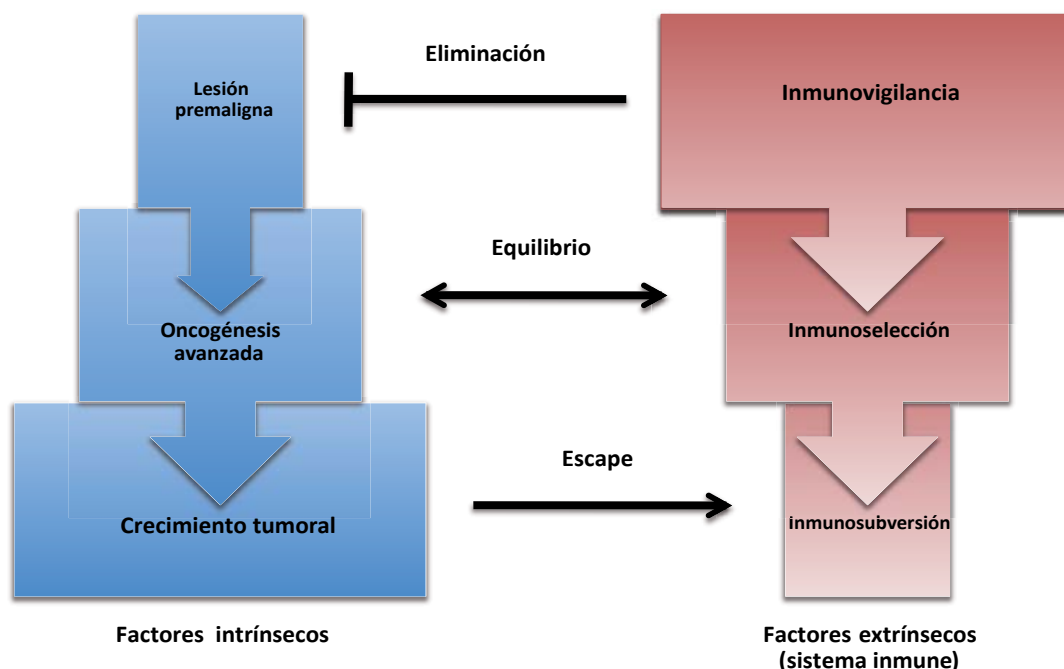


Figura I.1. Relación entre los factores celulares intrínsecos y extrínsecos que rigen el proceso de inmunomodulación tumoral. La inmunomodulación tumoral es un proceso dinámico que se produce en pasos sucesivos como resultado de los efectos de los factores extrínsecos sobre las células tumorales en desarrollo, y las modificaciones que éstas sufren por mecanismos intrínsecos a las propias células (modificado de Zitvogel et al., 2006).



1.2 Inmunoección tumoral.

Sin embargo, la **inmunovigilancia**, representa sólo una parte de la compleja relación entre un **tumor** y el **sistema inmune**. Dado que en individuos **inmunocompetentes** también se desarrollan tumores, es evidente que deben existir sistemas por los cuales las **células tumorales** puedan escapar al **reconocimiento y destrucción** por parte del **sistema inmune** y desarrollarse. Las causas de la aparición clínica de tumores se dividen en dos grupos: las **causas intrínsecas**, que son aquellas alteraciones que se producen en las propias células conduciendo a su transformación, y las **causas extrínsecas**, entre las que podemos incluir al sistema inmune. De hecho existen evidencias de que el propio **sistema inmune** puede promover la aparición de **tumores primarios de baja inmunogenicidad** ejerciendo una especie de presión selectiva sobre las células tumorales (Shankaran et al., 2001), que acumulan una serie de cambios sucesivos en un proceso dinámico que se denomina **inmunoección tumoral**, y que consta de tres fases: **eliminación, equilibrio y escape** (Figura I.1).

Figura I.2

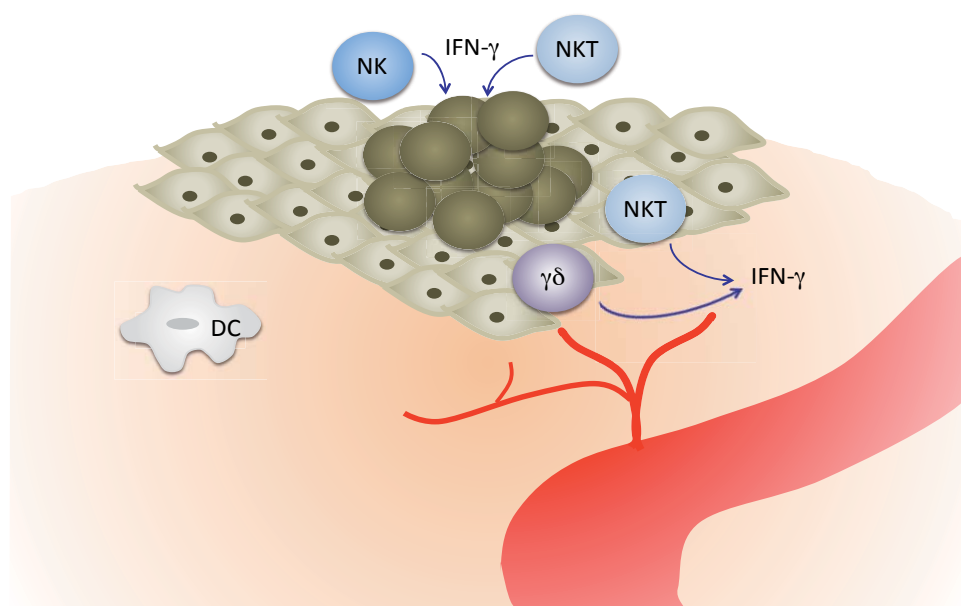


Figura I.2. Primera fase del proceso de eliminación tumoral. En el inicio de la respuesta, las células efectoras del sistema inmune innato son capaces de reconocer a las células transformadas, lo que induce la producción y secreción de IFN- γ por parte de aquéllas (modificada de Dunn et al., 2002).

1.2.1 Fase de Eliminación.

La fase de **eliminación** se corresponde con el concepto clásico de **inmunovigilancia**, en el que el **sistema inmune** es capaz de **impedir el desarrollo tumoral**, y el avance hacia las fases subsecuentes de este proceso. Al ser un factor de **control extrínseco**, el **sistema inmune** sólo actúa una vez que en las células **han fallado los mecanismos intrínsecos que evitan la**



INTRODUCCIÓN

transformación celular. En la **respuesta inmune antitumoral** participan tanto la **inmunidad innata** como la **adquirida**, y el proceso puede dividirse en **4 subfases**.

La **primera** de ellas comienza cuando las células del **sistema inmune innato** detectan la presencia de un **tumor en desarrollo** (Figura I.2), lo que se produce gracias a la **disrupción local del tejido** debido al inicio de la **invasión tumoral** (Hanahan y Weinberg, 2000) y al comienzo del **proceso angiogénico** (Hanahan et al., 1996). Durante este proceso se producen **moléculas proinflamatorias** que atraen a ciertas **células del sistema inmune** (NK, NKT, células $T\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas) a la zona (Waldhauer y Steinle, 2008; Terabe y Berzofsky, 2008; Girardi, 2006; Jaiswal et al., 2010; Chaput et al., 2008). Las células **NK**, **NKT** o $T\gamma\delta$ reconocen a las células transformadas, lo que induce la producción de **IFN- γ** por parte de aquéllas (Gao et al, 2003).

Figura I.3

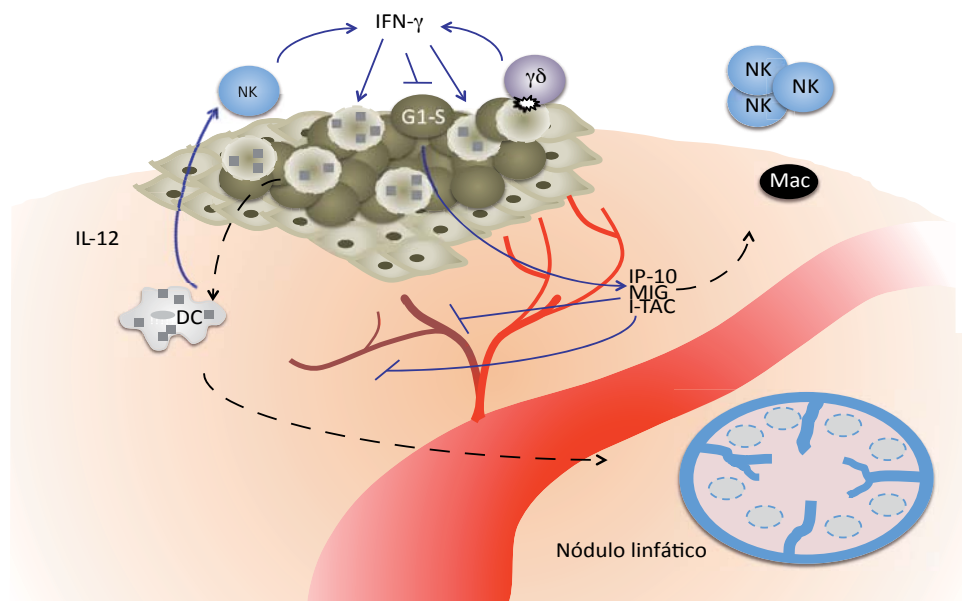


Figura I.3. Segunda fase del proceso de eliminación tumoral. El IFN- γ producido inicialmente por las células del sistema innato actúa a distintos niveles. El IFN- γ induce la producción de quimioquinas angiostáticas como CXCL10, CXCL9 y CXCL11, que evitan la formación de nuevos vasos sanguíneos y actúan como quimioatrayentes para otras células del sistema inmune. Por otro lado el IFN- γ actúa directamente sobre las células tumorales con efectos antiproliferativos. Además, esta citoquina es capaz de activar y potenciar la actividad citotóxica de las células efectoras del sistema inmune innato. Estos procesos producen la muerte de parte de las células del tumor, y los restos celulares (cuadrados) son ingeridos por las células dendríticas, que migran a los nódulos linfáticos cercanos (modificada de Dunn et al., 2002).

En una segunda fase (Figura I.3) el IFN- γ produce la muerte de algunas de las células tumorales gracias a sus **efectos antiproliferativos** (Yang et al., 2007) y **proapoptóticos** (Chawla-Sarkar et al., 2003) e induce la producción de ciertas **quimioquinas** como **CXCL10** (IP-10, *interferon-inducible protein-10*), **CXCL9** (MIG, *monokine induced by IFN- γ*) y **CXCL11**



(I-TAC, *interferon-inducible T cell α chemoattractant*) por parte de las propias células del tumor y de células normales de tejidos cercanos (Kaplan et al., 1987; Liao et al., 1995; Cole et al., 1998). Estas **quimioquinas** poseen potentes **efectos angiostáticos**, e impiden la formación de nuevos vasos que nutran al tumor, lo que genera una **mayor muerte celular** (Angiolillo et al., 1995; Belperio et al., 2000). Los **restos celulares** generados como consecuencia de estos procesos son ingeridos por **células dendríticas** presentes en la zona, que migran hacia los **nódulos linfáticos** cercanos, mientras que las **citoquinas** y **quimioquinas** producidas hasta el momento reclutan más células del **sistema inmune innato** a la zona.

En la **tercera fase** de este proceso las **células NK** y **macrófagos** infiltrados producen y liberan **IFN- γ** e **IL-12**, lo que produce su activación recíproca (Figura I.4). Estas células adquieren la capacidad de matar un mayor número de células tumorales mediante distintos mecanismos como la expresión de **TRAIL** y **perforina**, y la generación de **especies reactivas de oxígeno y nitrógeno** (Bancroft et al., 1987; Ikeda et al., 2002; Nedvetzki et al., 2007; Zwirner y Domaica, 2010).

Figura I.4

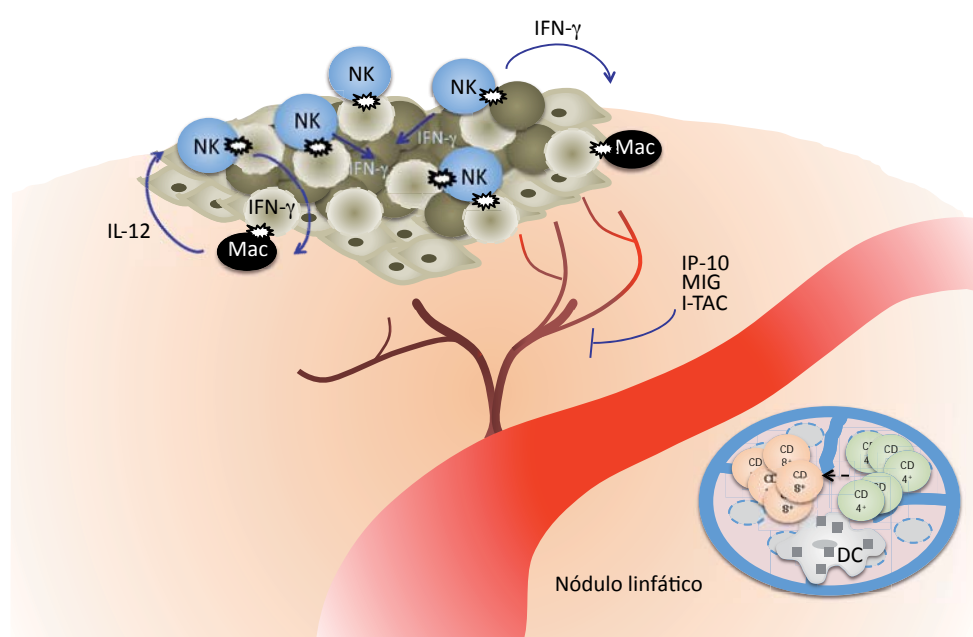


Figura I.4. Tercera fase del proceso de eliminación tumoral. Los componentes celulares del sistema inmune siguen actuando sobre las células transformadas, controlando el desarrollo tumoral. En los nódulos linfáticos cercanos las células dendríticas presentan antígenos tumorales específicos en un contexto MHC-I o MHC-II a las células T CD8⁺ y TCD4⁺, que se activan y proliferan (modificada de Dunn et al., 2002).

En la **última fase** del proceso de eliminación tiene lugar la **activación y proliferación en los nódulos linfáticos de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas** para el reconocimiento de **antígenos tumorales**. Esto se produce gracias a las **células dendríticas** que **migran desde el tumor a**



INTRODUCCIÓN

los **nódulos linfáticos** y allí **presentan antígenos tumorales específicos** a las **células T**. Tras su activación, **las células T se dirigen hacia el tumor siguiendo gradientes de citoquinas y quimioquinas** y, una vez allí, **las células T citolíticas destruyen las células tumorales** que expresan los antígenos para los que son específicas (**Figura I.5**).

Figura I.5

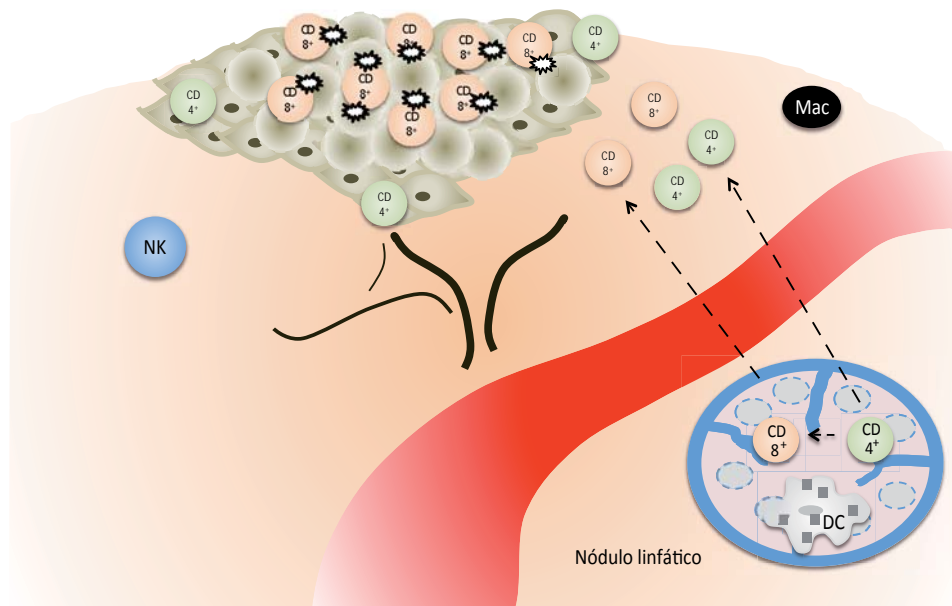
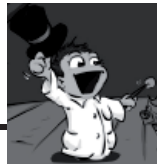


Figura I.5. Fase final del proceso de eliminación tumoral. Las células T CD8+ y T CD4+ específicas para antígenos tumorales, guiadas por gradientes de citoquinas y quimioquinas, migran hacia la región del tumor, donde reconocen y destruyen a las células que expresan los antígenos para los que son específicas (modificada de [Dunn et al., 2002](#)).

1.2.2 Fase de Equilibrio.

Como hemos visto, en la fase de **eliminación se destruyen gran cantidad de células tumorales**. Sin embargo, en ocasiones algunas de ellas pueden resistir la presión ejercida por el sistema inmune y sobrevivir. Existe un **periodo de latencia entre el final de la fase de eliminación y la aparición de los primeros signos clínicos de la enfermedad**. Esta etapa, que puede prolongarse por un periodo de tiempo variable, es lo que denominamos **fase de equilibrio**. Esta es una **etapa dinámica** en la que los procesos que hemos descrito en las fases anteriores llevan a la **aparición de nuevas variantes celulares** con distintas mutaciones que les proporcionan la capacidad de evadir o resistir al ataque inmunológico. La **gran plasticidad genética de las células tumorales**, producida por distintas alteraciones como la inestabilidad en los procesos de reparación del ADN, o la inestabilidad de los microsatélites y cromosómica ([Lengauer et al., 1998](#)), puede generar nuevos fenotipos con inmunogenicidad reducida, dando lugar a tumores de gran heterogeneidad ([Loeb et al., 2003](#)).



El proceso de **inmunoedición tumoral** no siempre sigue una **progresión lineal** desde la fase de eliminación a la de equilibrio, y de ahí a la fase de escape (**Figura I.6**). Es posible que nunca llegue a la fase de equilibrio si el sistema inmune consigue eliminar el tumor con éxito en un primer momento, o que desde el periodo de latencia progrese en tres direcciones distintas: la **eliminación posterior del tumor por parte del sistema inmune**, la **permanencia en la fase de equilibrio** de forma prolongada e incluso permanente gracias al control molecular y celular del sistema inmune, o el **escape de la presión ejercida por el sistema inmune** y el pase a la fase final del proceso de inmunoedición tumoral ([Dunn et al., 2004](#)).

Figura I.6

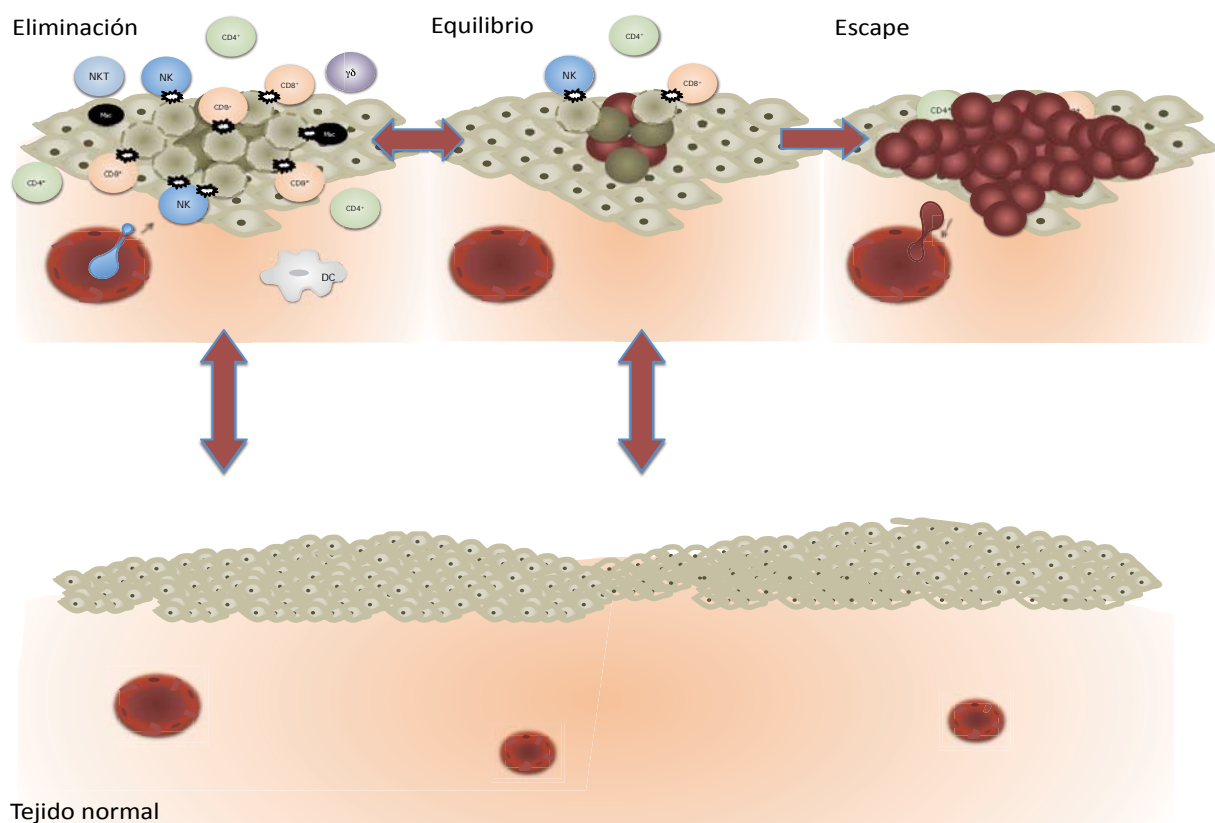


Figura I.6. Las tres fases de la inmunoedición tumoral. El sistema inmune puede eliminar un tumor en desarrollo en las dos primeras fases, volviendo a un estado de normalidad tisular. Si el tumor alcanza la fase de escape será capaz de crecer de forma incontrolada e incluso invadir otros tejidos a distancia.

1.2.3 Fase de Escape.

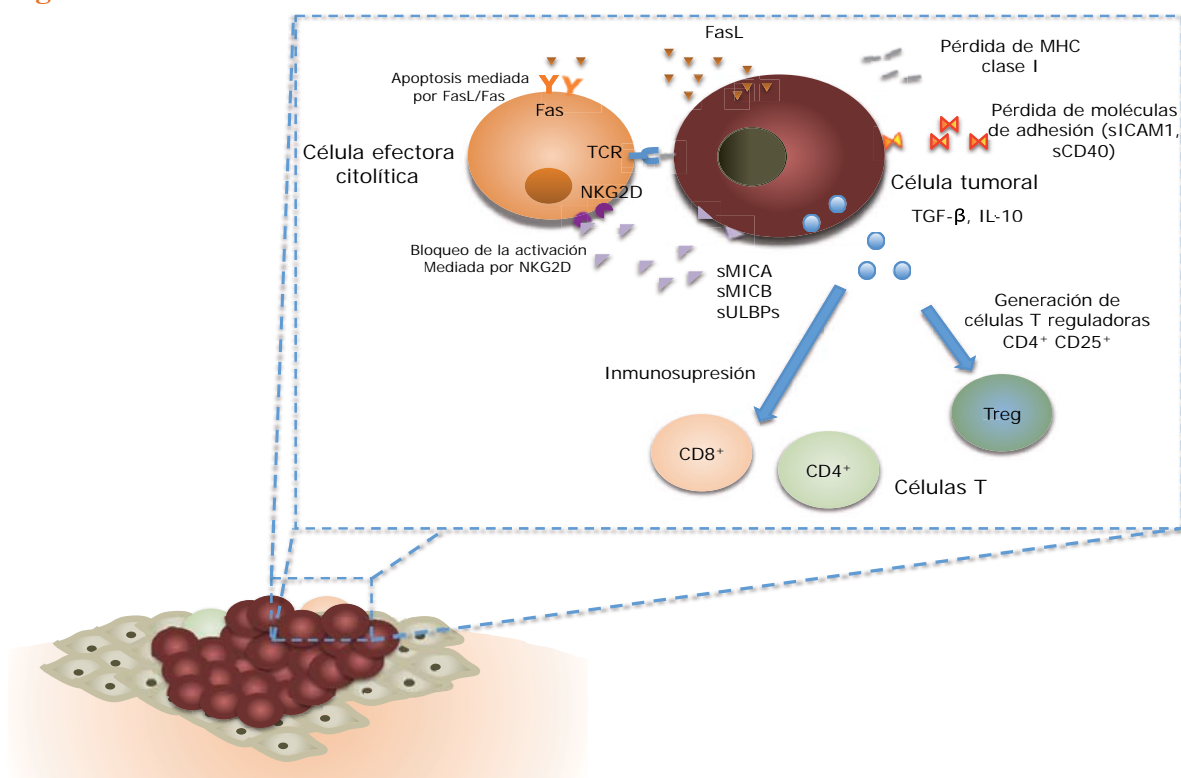
Algunas de las **variantes celulares generadas en la fase de equilibrio** adquieren la **capacidad de crecer en un ambiente inmunocompetente**, e incluso de inducir un estado de **supresión inmunológica o tolerancia** de diversas maneras (**Figura I.7**; [Poggi y Zocchi, 2006](#)).



INTRODUCCIÓN

Algunas células tumorales son capaces de producir **citoquinas inmunosupresoras** como TGF- β o IL-10 (Khong y Restifo, 2002). Otras pueden producir **formas solubles de ligandos de receptores activadores de células efectoras del sistema inmune**, lo que conduce a un descenso regulado de estos receptores. Por ejemplo, ciertos tumores pueden producir y secretar formas solubles de **MICA y MICB** (*MHC class I-related chain A y B*), ligandos del **receptor activador NKG2D**, presente en la mayoría de las **células NK, NKT, células T $\gamma\delta$ y células T CD8⁺** (Lanier, 2005). La presencia de estas versiones solubles de ligandos **atenúa la capacidad citotóxica de las células efectoras** (Groh et al., 2002). Otra de las formas en las que las células tumorales pueden disminuir la eficacia del sistema inmune es mediante la producción de **sustancias inhibitorias de la respuesta antitumoral**, como galectina-1 (Rubinstein et al., 2004) o indolamina 2,3-dioxigenasa (Zamanakou et al., 2007). Además ciertos tipos de células tumorales son capaces de **impedir la activación y maduración de las células del sistema inmune**, evitando la inducción de las señales proinflamatorias necesarias (Wang et al., 2004). Finalmente, las células tumorales pueden inducir la **aparición y activación de células inmunes reguladoras**, como las células **T CD4⁺ CD25⁺** (Liu et al., 2007), que inducen un estado de tolerancia inmunológica (McHugh y Shevach, 2002). Todos estos mecanismos llevan a la expansión del tumor de manera incontrolada y, finalmente, a la manifestación clínica de la enfermedad y, si no se logra controlar con un tratamiento apropiado, a la muerte del organismo portador del tumor.

Figura I.7





1.3 Papel de los distintos componentes del sistema inmune en el desarrollo y eliminación de tumores.

Existen numerosas evidencias de que **el sistema inmune de un organismo inmunocompetente es capaz de reconocer y eliminar células tumorales**. Estos procesos se llevan a cabo de diversas maneras, utilizando distintos mecanismos según las características de las células que componen el tumor. En estas funciones del sistema inmune **están implicados el sistema innato y el adquirido**, y participan **tanto sus componentes celulares como los moleculares** (revisado en Dunn et al., 2006; Zitvogel et al., 2006).

1.3.1 Componentes celulares.

El uso de **ratones transgénicos deficientes en distintos tipos de células inmunes** ha puesto de manifiesto la importancia de cada uno de ellos en la respuesta inmune antitumoral, ya que estas deficiencias inducen en los ratones una **mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores**, ya sea espontáneos o inducidos químicamente (Tabla I.1).

Así, ratones deficientes en **RAG-2** o **RAG-1** (*recombination-activating gene 2 ó 1*), que debido a que no son capaces de reorganizar sus receptores antigénicos **carecen de células T, B y NKT** (Shinkai et al., 1992), sufren una **mayor incidencia de tumores gastrointestinales espontáneos y sarcomas inducidos químicamente mediante la inyección de 3-MCA** (Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2001). La alteración en la expresión de la **cadena invariable del TCR de las células NKT ($J\alpha 18$)** produce un **aumento en la incidencia de tumores inducidos químicamente** (Smyth y Godfrey, 2000). La **carencia de las cadenas β o δ del TCR**, que conduce a la **deficiencia en células $T\alpha\beta$ o $T\gamma\delta$** respectivamente, produce una **mayor incidencia de tumores químicos**, como sarcomas inducidos por la inyección de **3-MCA** o tumores cutáneos inducidos por **DMBA y TPA** (Girardi et al., 2003).



Figura I.7. Mecanismos de evasión de las células tumorales. Las células tumorales pueden escapar del control del sistema inmune mediante distintos mecanismos. La pérdida de la expresión de moléculas de histocompatibilidad impide el reconocimiento por parte de las células T. La expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 también puede verse disminuida, lo que las hace menos susceptibles a la acción citolítica de las células del sistema inmune. Las células tumorales también pueden liberar factores solubles, como TGF- β o IL-10, que inducen un estado de inmunosupresión y promueven la aparición de células T reguladoras. La liberación de formas solubles de moléculas activadoras de las células efectoras del sistema inmune, como MICA, MICB o las ULBP1-4, bloquea la activación de estas células. Por otra parte las células tumorales pueden inducir la muerte de las células inmunes mediante la liberación de FasL, en un proceso de actuación directa sobre el sistema inmune que se conoce como inmunosubversión.



INTRODUCCIÓN

Se han obtenido resultados similares utilizando **anticuerpos anti-Thy1** para eliminar la presencia de **células T** (Smyth et al., 2000b). La utilización de **anticuerpos anti-NK1.1**, que eliminan a las **células NK y NKT**, o **anti-asialo-GM1**, específicos para **células NK y macrófagos activados**, condujo a los mismos resultados, siendo los ratones tratados con estos anticuerpos **más susceptibles al desarrollo de tumores inducidos por 3-MCA** (Smyth et al., 2000; Smyth et al., 2001). Por el contrario, los ratones tratados con **anticuerpos anti-CD25**, que disminuyen la presencia de **células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺**, presentan una **susceptibilidad reducida al desarrollo de tumores** (Tawara et al., 2002), lo que sugiere que estas células favorecen el proceso de escape tumoral.

Tabla I.1

Fenotipo o depleción	Inmunodeficiencia	Susceptibilidad	Referencias
RAG-2 ^{-/-}	Células T, B y NKT	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Shankaran et al., 2001
RAG-1 ^{-/-}	Células T, B y NKT	Neoplasia intestinal espontánea. Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Smyth et al., 2001
TCRβ ^{-/-}	Células Tαβ	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Girardi et al., 2003
TCRδ ^{-/-}	Células Tγδ	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Girardi et al., 2003
Jα18 ^{-/-}	Células NKT	Tumores cutáneos inducidos por DMBA y TPA. Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Smyth et al., 2000 Smyth et al., 2001
Anti-Thy1	Células T	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Street et al., 2001 Smyth et al., 2000b
Anti-NK1.1	Células NK y NKT	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Smyth et al., 2000 Smyth et al., 2001
Anti-asialo-GM1	Células NK, monocitos/macrófagos	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Smyth et al., 2001

Tabla I.1. Susceptibilidad tumoral de los ratones deficientes en distintos tipos de células inmunes.

1.3.2 Componentes moleculares.

De la misma manera que se han realizado estudios que demuestran la importancia de distintas células del sistema inmune en la **respuesta antitumoral**, se ha comprobado que hay numerosas **moléculas efectoras que juegan un importante papel** en este proceso (Tabla I.2).

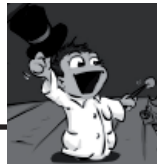


Tabla I.2

Fenotipo o depleción	Inmunodeficiencia	Susceptibilidad	Referencias
Pfp ^{-/-}	Perforina	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Street et al., 2001
			van den Broek et al., 1996
TRAIL ^{-/-}	TRAIL	Linfomas diseminados espontáneos.	Smyth et al., 2000c
		Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Cretney et al., 2002
Anti-TRAIL	Bloqueo de TRAIL	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Takeda et al., 2002
		Sarcomas espontáneos.	Zerafa et al., 2005
IL-12 ^{-/-}	IL-12	Linfomas diseminados espontáneos.	
		Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Smyth et al., 2000a
IFNAR1 ^{-/-}	Insensible a IFN- α/β	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Dunn et al., 2005
			Smyth, 2005
Anti-IFN- α/β	IFN- α/β	Tumores singénicos transplantados.	Gresser et al., 1983
IFNGR1 ^{-/-}	Insensible a IFN- γ	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Kaplan et al., 1998
IFN- γ ^{-/-}	IFN- γ	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Street et al., 2001
			Street et al., 2002
		Linfomas diseminados espontáneos.	
		Adenocarcinomas de pulmón espontáneos.	
Stat1 ^{-/-}	Insensible a IFN- $\alpha/\beta/\gamma$	Sarcomas inducidos por 3-MCA.	Kaplan et al., 1998
			Shankaran et al., 2001
		Carcinoma de mama.	

Tabla I.2. Susceptibilidad tumoral de ratones deficientes en distintos componentes moleculares del sistema inmune.

Las **células citotóxicas** pueden eliminar células tumorales de dos maneras distintas: a través de la **exocitosis de gránulos líticos** o **induciendo la apoptosis mediada por ligandos** de muerte celular. En la muerte inducida por exocitosis de gránulos líticos por parte de las células efectoras del sistema inmune, la **perforina** juega un papel crítico, insertándose en la membrana y formando canales que permitirán la llegada al citoplasma de las células diana de otras proteínas presentes en los gránulos, como las **granzimas**, que gracias a su actividad serín-proteasa cortan substratos proteicos que inducen la muerte celular (Trapani y Smyth, 2002). En **ratones deficientes en perforina** se ha observado una **mayor susceptibilidad a la formación de tumores por carcinogénesis química o viral**, como es el caso de tumores inducidos por 3-MCA, DMBA y TPA, o por inyección del virus del sarcoma de Moloney (Street



INTRODUCCIÓN

et al., 2001; van den Broek et al, 1996) y a la aparición de linfomas espontáneos (Smyth et al, 2000c). Se ha demostrado también que los ligandos de muerte celular, que inducen el proceso de apoptosis, poseen un papel en la inmunovigilancia antitumoral. **TRAIL** (*tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand*) es uno de estos ligandos. **TRAIL se expresa constitutivamente en células NK**, y puede inducirse en otros tipos celulares, como **células dendríticas y células T** (Smyth et al., 2003). La unión de TRAIL a sus receptores TRAIL-R1 o TRAIL-R2 inicia el proceso apoptótico en la célula receptora, conduciendo a su eliminación. La **neutralización de TRAIL** mediante anticuerpos específicos **incrementa la susceptibilidad al desarrollo de linfomas espontáneos** (Zerafa et al., 2005) y de otros **tumores causados por mutaciones en p53** (Takeda et al., 2002; Zerafa et al., 2005). Además, los ratones deficientes en TRAIL presentan una mayor susceptibilidad a la aparición de **tumores inducidos por 3-MCA** (Cretney et al., 2002). La presencia de **mutaciones en otros ligandos de muerte celular**, como FasL, también **favorecen el desarrollo de linfomas** (Davidson et al, 1998).

Entre las moléculas que participan en el proceso de eliminación tumoral tienen especial importancia las **citoquinas**, que son **producidas por las células del sistema inmune y por las células estromales en respuesta a señales inflamatorias procedentes del tumor en desarrollo, y por las propias células transformadas**, que producen y secretan diversos tipos de citoquinas al ambiente tumoral. **El balance de citoquinas presentes en la región tumoral es lo que va a determinar que la respuesta inmune se incline hacia la eliminación del tumor o la tolerancia**. Las **citoquinas de tipo I (IL-2, IL-12, TNF, IFN- γ)** inducen una respuesta mediada por **células T CD4⁺ y T CD8⁺ tipo 1 (Th1 y Tc1)**, promoviendo la **inmunidad celular** frente a las células tumorales, mientras que las **citoquinas de tipo II (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13)** están implicadas en la respuesta mediada por **células T CD4⁺ tipo 2 (Th2)**, que promueve la **inmunidad humoral y la desviación hacia un estado de tolerancia**. La generación de **ratones transgénicos deficientes en distintas citoquinas o sus receptores** han permitido estudiar las funciones fisiológicas de cada una de estas moléculas, poniendo de manifiesto su importancia en los procesos de eliminación tumoral, o escape del sistema inmune. Por ejemplo, **IL-12**, que juega un papel fundamental en la **interacción entre los sistemas innato y adquirido**, es una de las citoquinas con actividad antitumoral (Brunda et al., 1993). Se han realizado numerosos estudios que demuestran el papel de IL-12 contra diversos tipos de tumores en modelos murinos (revisado en Colombo y Trinchieri, 2002), de los que se deduce que sus efectos dependen de la inmunogenicidad del tumor, la dosis, la ruta de administración, la sensibilidad a IFN- γ del tumor, y su dependencia de la neo-angiogénesis. La IL-12 endógena participa en el rechazo de tumores transplantados y la eliminación de tumores inducidos por 3-MCA (Smyth et al., 2000a), mientras que **el tratamiento con IL-12 exógena tiene un potente efecto antitumoral frente a tumores transplantados** (Liu et al., 2003), **inducidos químicamente** (Noguchi et



al., 1996) y frente a tumores espontáneos en ratones modificados genéticamente (Boggio et al., 1998; Roy et al., 2000). El papel antitumoral de otras citoquinas de la familia de IL-12, como IL-23 o IL-27, ha sido menos estudiado. Sin embargo, se sabe que la administración de **IL-23 exógena puede inducir una respuesta antitumoral de tipo 1** (Kaiga et al., 2007) y que **IL-27 posee efectos antitumorales variados** (revisado en Xu et al., 2010). GM-CSF se sintetiza por parte de las células dendríticas maduras y actúa como coordinadora entre las respuestas celular y humoral (Dranoff et al., 1993). El tratamiento con **GM-CSF promueve la respuesta antitumoral protectora en distintos modelos murinos** (revisado en Dranoff, 2002). Se ha observado que la **administración sistémica de IL-2 tiene un importante efecto en sarcomas primarios y metastáticos** (Rosenberg et al., 1985), **melanomas metastáticos y cáncer de células renales** (Rosenberg et al., 1994), y **a altas dosis inhibe el desarrollo de leucemias diseminadas en ratones** (Thompson et al., 1986). Por su parte **IL-21 aumenta la citotoxicidad y la producción de citoquinas por las células NK, induce su maduración** (Wang et al., 2003a; revisado en Nutt et al., 2004) y **promueve la acción antitumoral de las células T** (Ma et al., 2003).

De entre todas las moléculas inmunes, los interferones son sin duda las citoquinas de las que mejor se ha caracterizado su actividad antitumoral. **Los interferones tipo I, fundamentalmente IFN- α , inducen respuestas antitumorales efectivas frente al desarrollo de tumores en ratones y humanos** (revisado en Belardelli et al., 2002 y Gresser y Belardelli, 2002). El IFN- α **aumenta la actividad citotóxica de las células NK** (Trinchieri, 1981) y **estimula su proliferación** (Biron et al., 1984). Induce, además, la **producción y secreción de otras citoquinas** (Taylor y Grossberg, 1998), **actúa en distintos procesos de la respuesta inmune adquirida** (Chen et al., 1986; revisado en Prchal et al., 2009) e **induce un aumento en la expresión de los complejos principales de histocompatibilidad de clase I y II en las células tumorales** (Fellous et al., 1982). La **neutralización de los interferones de tipo I mediante anticuerpos específicos favorece el crecimiento progresivo de tumores singénicos transplantados en ratones** (Gresser et al., 1983) e **impide el rechazo de alotransplantes tumorales** (Gresser et al., 1988). Se ha demostrado además que los **ratones deficientes en el receptor para los interferones de tipo I son más susceptibles al desarrollo de tumores inducidos químicamente por 3-MCA** que los ratones de fenotipo silvestre (Dunn et al., 2005; Smyth, 2005). El **interferón tipo II, también llamado IFN- γ o interferón inmune** también ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su capacidad de controlar el desarrollo de tumores, y es precisamente al IFN- γ al que **se le atribuye la actividad antitumoral más importante**.



1.4 Importancia del IFN- γ en la respuesta inmune antitumoral.

El IFN- γ es una **proteína homodimérica N-glicosilada**, formada por dos subunidades de entre 21 y 24 kDa, que varían en su grado de glicosilación (Fountoulakis et al., 1990). Al no presentar puentes disulfuro, es una proteína **termosensible**, que sufre desnaturalización irreversible en solución a temperaturas entre 40-65°C. Es sensible también al pH ácido, perdiendo su actividad a pH por debajo de 2.3 (revisado en Younes y Amsdem, 2002). El IFN- γ posee un **receptor específico (IFNGR)**, formado por dos cadenas a las que se une el propio IFN- γ (IFNGR1), y dos cadenas transductoras de la señal (IFNGR2), que se asocian por su región citoplasmática a otras proteínas que forman parte de la maquinaria de señalización (revisado en Schroder et al., 2004). **El receptor de IFN- γ se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos** (Bach et al., 1997). La vía de transducción de señales que utiliza el IFN- γ es la **vía de JAK/STAT**, que es utilizada por otras muchas citoquinas, factores de crecimiento y hormonas (Subramaniam et al., 2001). Tras la **interacción entre el IFN- γ y su receptor** los dominios intracelulares de las cadenas del receptor sufren un **cambio conformacional** que permite la **asociación con otros componentes señalizadores citoplasmáticos**. La unión del ligando al receptor induce la **autofosforilación de JAK2 y su activación**, lo que permite la **transfosforilación de JAK1 por parte de JAK2** (Figura I.8). La activación de estas proteínas lleva a la **fosforilación** de ciertos **residuos de tirosina de las cadenas IFNGR1**, formándose dos **sitios de anclaje para los dominios SH2** de factores como STAT1. La interacción de STAT1 con estos dominios de anclaje permite la **fosforilación de homodímeros de STAT1**, que induce su disociación del receptor, y viajan hasta el **núcleo**, donde se unirán a determinados **elementos promotores**, lo que produce una **variación en los patrones de expresión** de distintos genes.

Además de generarse **homodímeros de STAT1**, pueden formarse otros complejos como **heterodímeros de STAT** (STAT1:STAT2) y **heterotrímeros** (STAT1:STAT1:IRF-9, STAT1:STAT2:IRF-9) que actúan sobre otros elementos promotores en el núcleo (revisado en Stark et al., 1998). El cambio que el IFN- γ produce en los patrones de expresión genéticos en distintos tipos celulares es clave para determinar sus funciones.

En el caso de la **implicación del IFN- γ en el proceso de inmunovigilancia**, sus efectos pueden agruparse en **dos conjuntos de acción principales** (Figura I.9): **funciones no inmunológicas**, como sus efectos antiproliferativos y proapoptóticos en las células tumorales o su acción angiogénica, y **funciones inmunológicas**, tanto sobre el sistema inmune innato, como sobre el adquirido (revisado en Ikeda et al., 2002).

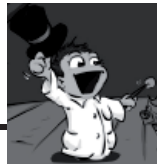


Figura I.8

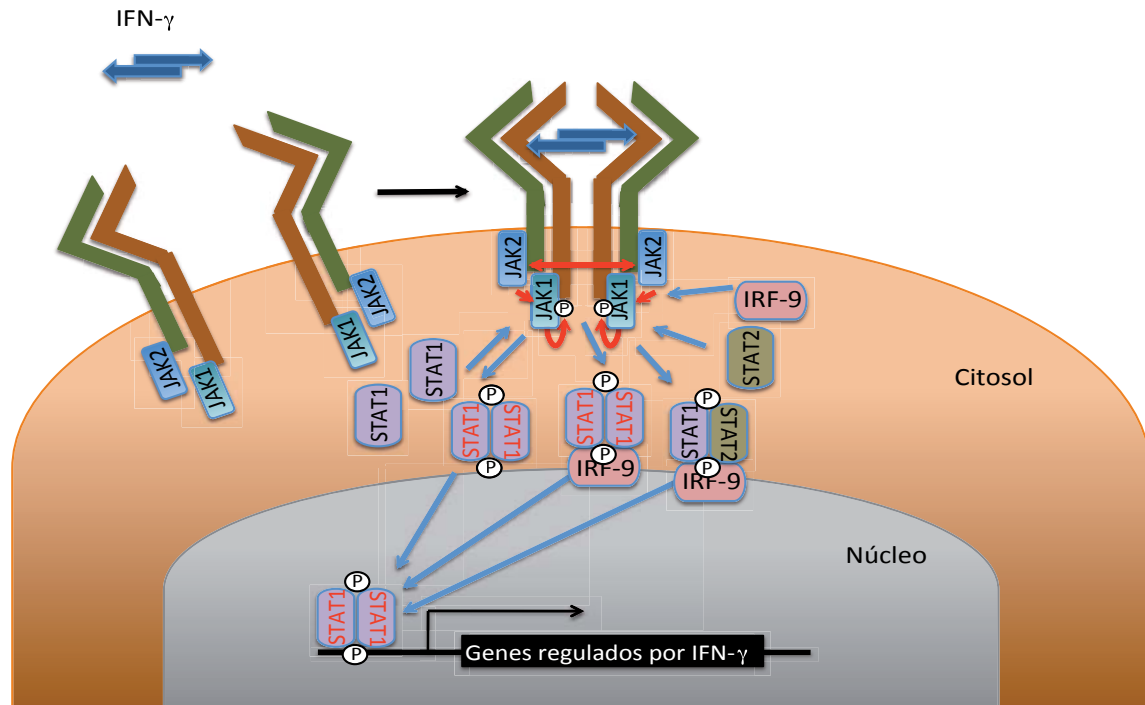


Figura I.8. Vía de señalización de IFN- γ . La unión del IFN- γ a su receptor (IFNGR1, marrón; IFNGR2, verde) produce un cambio conformacional en este último, lo que permite la autofosforilación de JAK2, que a su vez transfosforila a JAK1. Una vez activo, JAK1 fosforila residuos de tirosina (Tyr440) de cada IFNGR1, lo que genera dos sitios de anclaje para dominios SH2. STAT1 se une a estos sitios de anclaje, lo que permite su fosforilación y dimerización. Los dímeros se trasladan al núcleo, donde interactúan con las regiones promotoras que controlan la expresión de los genes regulados por IFN- γ , modificando los patrones de expresión de estos genes.

1.4.1 Funciones no inmunológicas del IFN- γ .

Estos efectos se basan fundamentalmente en la **acción del IFN- γ directamente sobre las células tumorales**, dificultando su supervivencia, o **sobre células estromales y tejidos sanos cercanos a la región del tumor**, induciendo la producción de distintas moléculas con funciones antiangiogénicas, con el fin de impedir el aporte de nutrientes al tumor en desarrollo.

1.4.1.1 Efectos antiproliferativos y proapoptóticos del IFN- γ .

El IFN- γ ejerce **efectos antiproliferativos directamente en una gran variedad de células tumorales**. La base molecular de este efecto se debe a la activación de STAT1 en las células tumorales, que **induce la expresión de proteínas inhibitoras de la progresión del ciclo celular**, como p21 y p27, que se unen a las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) e impiden su actividad quinasas (Mandal et al., 1998). Este proceso ocurre en distintos tipos de tumores, como fibrosarcomas (Chin et al., 1996), mesoteliomas (Buard et al., 1998) y rabdomiosarcomas (Chen et al., 2000). Por otra parte, el IFN- γ también está implicado en la **apoptosis de las**



células tumorales, ya que STAT1 **induce la expresión** de genes que codifican para proteínas que promueven la apoptosis, como **caspasa-1** o **Fas** (Detjen et al., 2001; Xu et al., 1998).

Figura I.9

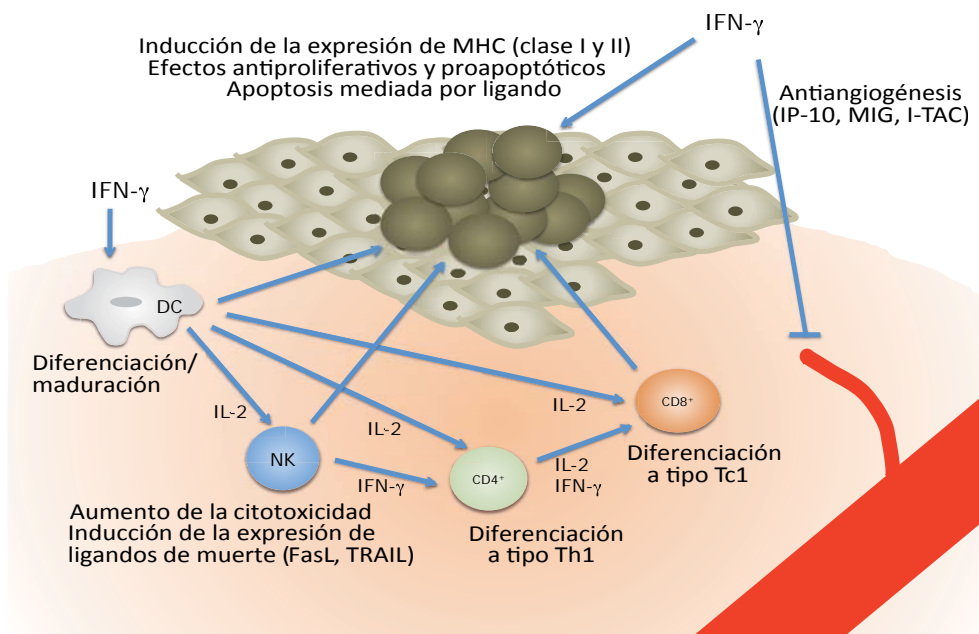


Figura I.9. Mecanismos de acción del IFN-γ. El IFN-γ actúa a varios niveles en el proceso de inmunovigilancia. La sensibilidad de las células tumorales al IFN-γ determina la eficacia de los efectos de esta citoquina sobre la inmunogenicidad de estas células y su capacidad proliferativa. El IFN-γ promueve la expresión de quimioquinas antiangiogénicas y actúa además sobre las células del sistema inmune favoreciendo su activación, aumentando su capacidad citotóxica e induciendo una respuesta inmune de tipo 1.

1.4.1.2 Inhibición de la angiogénesis por parte del IFN-γ.

Existen evidencias de que los efectos antitumorales del IFN-γ se deben en parte a su **capacidad de inhibir la angiogénesis** (Lu et al., 2009). Los tumores en desarrollo requieren un gran aporte sanguíneo para crecer. **El grado de vascularización de un tumor depende del balance entre las señales proangiogénicas y antiangiogénicas** producidas por las células tumorales, las células estromales y las células inmunes infiltradas en la región tumoral (Hanahan et al., 1996; Fidler, 2000). Las **células tumorales** suelen producir **factores proangiogénicos** como VEGF o FGF (Dvorak, 2002), mientras que el IFN-γ induce la **producción de quimioquinas como CXCL10, CXCL9 y CXCL11** (Kaplan et al., 1987; Liao et al., 1995; Cole et al., 1998). Estas quimioquinas ejercen un **potente efecto antiangiogénico** que bloquea la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor (Belperio et al., 2000; Strieter et al., 2005), regulando negativamente la expresión de factores que favorecen la neovascularización, como VEGF y metaloproteasas de la matriz extracelular (Dias et al., 1998), e inhibiendo la proliferación de las células endoteliales (Feldman et al., 2006).



1.4.2 Funciones inmunológicas del IFN- γ .

Los efectos inmunológicos del IFN- γ se basan en aquellas acciones que inducen la activación de la respuesta inmune frente a tumores. En primer lugar, **el IFN- γ puede actuar sobre las células tumorales aumentando su inmunogenicidad**, induciendo un **aumento en la expresión de los complejos principales de histocompatibilidad de clase I y II** (Weber y Rosenberg, 1988; Mach et al., 1996; Ikeda et al., 2002) y otras proteínas que se requieren para el **proceso de presentación antigénica**, como los transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAP)-1 y TAP-2, y componentes del proteasoma LMP-2 y LMP-7 (Seliger et al., 1996), o las catepsinas (Lah et al., 1995). **El aumento en la inmunogenicidad de las células tumorales permite su reconocimiento por parte de las células del sistema inmune innato, y potencia el reconocimiento por parte de las células T específicas** (Ritter et al., 1994), lo que favorece la eliminación del tumor. **El IFN- γ inhibe, además, la producción de factores inmunosupresores** como TGF- β e IL-10 (Naganuma et al., 1998) e **induce la producción de citoquinas activadoras de la respuesta inmune**, como IL-1 e IL-12, lo que induce la activación de las células NK y promueve una respuesta de tipo 1 (Yoshida et al., 1994; Kubin et al., 1994). La inducción de la producción de quimioquinas como CXCL10 y CXCL9 no sólo tiene un efecto antiangiogénico, sino que estas quimioquinas actúan como **quimioatrayentes para monocitos y células T** (Taub et al., 1993; Liao et al., 1995). El IFN- γ **induce la expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras**, como ICAM-1 o VCAM, lo que favorece la activación y actuación de las células del sistema inmune (Hou et al., 1994; Jesse et al., 1998). Finalmente, sobre las propias **células del sistema inmune**, el IFN- γ induce su **maduración y activación, y aumenta su citotoxicidad** (Ullrich et al., 2008; Boehm et al., 1997; Smyth et al., 2001).

Es de esperar que, dada la importancia de las funciones antitumorales del IFN- γ , la ausencia de éste impida la eliminación de diversos tipos de tumores. Se han realizado numerosos estudios que demuestran que el IFN- γ es, de hecho, **esencial para el proceso de inmunovigilancia antitumoral en organismos inmunocompetentes** (Kaplan et al., 1998; Nishimura et al., 2000; Wakita et al., 2009). La utilización de **ratones 129/SvEv transgénicos deficientes en IFNGR1 (IFNGR1^{-/-}) o STAT1 (Stat1^{-/-})**, y por tanto insensibles a la acción del IFN- γ , permitió demostrar que esta citoquina es necesaria para **prevenir el desarrollo de tumores inducidos químicamente con 3-MCA** (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001), siendo los **ratones insensibles a IFN- γ entre 10 y 20 veces más susceptibles a la aparición de estos tumores que los ratones de fenotipo silvestre** (Kaplan et al., 1998). Se han observado resultados similares a estos en **ratones C57BL/6 deficientes en IFN- γ (IFN- γ ^{-/-})** (Street et al., 2001). Las funciones del IFN- γ son también esenciales para **prevenir la aparición de tumores**



espontáneos producidos por alteraciones en el control del ciclo celular. En ratones 129/SvEv deficientes en p53 y en el receptor de IFN- γ (p53^{-/-} x IFNGR^{-/-}) o STAT1 (p53^{-/-} x Stat1^{-/-}) (Kaplan et al., 1998), o IFN- γ (p53^{-/-} x IFN- γ ^{-/-}) (Street et al., 2001; Street et al., 2002), se observa una **mayor incidencia de tumores** que en ratones p53^{-/-} 129/SvEv. Además, los ratones Stat1^{-/-} desarrollan tumores de mama espontáneos con mayor frecuencia que los ratones de fenotipo silvestre en los fondos genéticos 129/SvEv y C57BL/6 (Shankaran et al., 2001). En ratones IFN- γ ^{-/-} BALB/c se ha observado la aparición de **adenocarcinomas de pulmón**, mientras que los ratones IFN- γ ^{-/-} C57BL/6 desarrollan **linfomas de células T** (Street et al., 2002). Por otra parte la utilización de **anticuerpos neutralizantes específicos para IFN- γ** impide la eliminación de tumores transplantados inducida por LPS (Dighe et al., 1994) y la expresión de **mutantes dominantes negativos del receptor de IFN- γ** en líneas celulares derivadas de sarcomas disminuye la inmunogenicidad de éstas al inyectarse en ratones singénicos (Dighe et al., 1994). Estos resultados en conjunto indican que **el IFN- γ juega un importante papel en el control del desarrollo de tumores de diversos orígenes**. Este hecho convierte al IFN- γ en un posible agente terapéutico para el tratamiento de distintos tipos de tumores.

2. Utilización de citoquinas en inmunoterapia antitumoral.

Se ha evaluado la eficacia antitumoral de diversas **citoquinas en ensayos preclínicos y clínicos**, entre las que se encuentran **IL-2, IL-12, IL-4, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-15, GM-CSF, IL-24 y TNF- α** , solas o en combinación (revisado en Li et al., 2005; Chada et al., 2003). Los resultados han sido variables, dependiendo fundamentalmente de la vía de administración (Tabla I.3). La **administración sistémica** de citoquinas presenta varias desventajas. La alta concentración de citoquina requerida produce la aparición de **importantes efectos secundarios**, como hipotensión, aumento de la permeabilidad vascular, insuficiencia cardíaca y respiratoria, toxicidad renal y hepática, fiebre, coagulopatías y letargia, que en los casos más graves pueden ser letales (Vial y Descotes, 1995). A pesar de ello, **las concentraciones de citoquinas obtenidas suelen estar órdenes de magnitud por debajo de la concentración requerida** en la región de interés para activar la respuesta inmune, y el **aumento en los niveles de citoquinas es transitorio**, ya que estas moléculas se eliminan rápidamente por aclaramiento renal y hepático, por lo que no hay tiempo suficiente para la movilización y activación del sistema inmune (Li et al., 2005).

2.1 Sistemas de distribución/liberación de citoquinas en inmunoterapia.

Uno de los métodos con los que se ha intentado evitar estos problemas es la **terapia génica**, en la que se administran **vectores genéticos de expresión de distintas citoquinas**. Estos métodos permiten **incrementar la dosis de citoquinas localmente y proporcionan un aumento en los niveles de**



estas moléculas de formas sostenida. Se han utilizado distintos vectores, como varios tipos de virus, vectores virales desnudos, plásmidos y células modificadas para la expresión y liberación de citoquinas. Los resultados han sido variables dependiendo del tipo de vector o célula utilizados.

Tabla I.3

Citoquinas	Aplicación	Efectos secundarios	Referencias
IL-2	-Administración sistémica.	-Hipotensión.	Fisher et al., 2000
	-Fibroblastos modificados.	-Toxicidad renal y hepática.	Atkins et al., 2000
	-Vectores virales en melanoma y cáncer de mama.	-Inflamación.	Rochlitz et al., 1998
	-Microesferas de A. poliláctico.		Arora et al., 2006
IL-4	-Administración sistémica en melanoma.		Whitehead et al., 1998
	-Células tumorales modificadas.		Lotze et al., 1994
IL-12	-Administración sistémica.	-71% fallo renal	Leonard et al., 1997
	-Células tumorales modificadas e irradiadas.	-12% muerte.	Sun et al., 1998
IFN- α	-Fibroblastos modificados.	-Fiebre.	Kang et al., 2001
	-Administración sistémica.	-Deshidratación.	Sertoli et al., 1989
		-Fatiga crónica.	
IFN- γ	-Administración sistémica.	-Aumento de las enzimas hepáticas.	Jett et al., 1994
	-Células tumorales modificadas.	-Mialgia.	Abdel-Wahab et al., 1997
	-Vectores virales.	-Letargia.	
TNF- α	-Administración sistémica.	-Alteración de la personalidad.	Kircheis et al., 2002
	-Polímero de polietilenimina.	-Coagulopatía diseminada.	Arora et al., 2006
	-Microesferas de A. poliláctico.	-Acidosis metabólica.	
GM-CSF		-Fallo multiorgánico.	
		-Shock letal.	
	-Células tumorales modificadas.		Tani et al., 2004
	-Microesferas de A. poliláctico.		Arora et al., 2006

Tabla I.3. Algunas aplicaciones clínicas de algunas citoquinas en terapia antitumoral.

El principal problema que presentan estas estrategias es la **necesidad de inyectar los vectores en la masa tumoral o en regiones muy cercanas a ella**, lo que en ocasiones presenta **problemas de accesibilidad** debido a la localización del tumor, o puede dar lugar a **infecciones y formación de fístulas** (Wenig et al., 2002). Por otra parte existen evidencias de que **incluso la inyección**



local de estos vectores puede producir la diseminación de los mismos en el organismo (Wang et al., 2003b), pudiendo generar efectos adversos en otras regiones (Varnavski et al., 2005). Los resultados más prometedores se han obtenido utilizando **microesferas poliméricas o geles en los que se incluyen las citoquinas de interés**. Estos compuestos proporcionan una **liberación continuada de citoquina** y, al estar formados por materiales biocompatibles, **no generan reacciones tóxicas**. Sin embargo, al igual que los vectores genéticos, **deben administrarse directamente en la zona de acción y no pueden ser inmovilizados** en la región de interés. Hasta ahora los resultados no han sido los esperados, principalmente debido a la **dificultad en conseguir una dosis terapéuticamente relevante sin generar una toxicidad tisular excesiva**. Con este fin se están desarrollando nuevos sistemas de administración de drogas que permitan una **distribución localizada** de las mismas y su inmovilización durante el mayor tiempo posible, **minimizando los efectos secundarios**. Algunos de estos sistemas se basan en el uso de **nanopartículas magnéticas**, que pueden **dirigirse y mantenerse en la región de interés mediante el uso de campos magnéticos externos**, y representan uno de los campos de investigación más activos en la actualidad (revisado en Krishnan, 2010).

3. Sistemas de distribución de fármacos basados en nanopartículas.

La aplicación de terapias basadas en nuevos fármacos se ve en ocasiones comprometida por las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, que pueden presentar una **solubilidad y biodistribución** reducidas, una rápida **eliminación** o generar **reacciones adversas** al ser administradas (Kingsley et al., 2006). Una de las posibilidades para mejorar estas propiedades es **asociar los fármacos a un agente transportador farmacológico** (Kim y Lim, 2002). Las nanopartículas, que se definen como **partículas coloidales sólidas y estables de tamaño submicrónico**, se introdujeron en biomedicina con este fin, siendo utilizadas en primer lugar como transportadores de agentes quimioterapéuticos, aunque posteriormente se desarrollaron otras aplicaciones biomédicas (Tabla I.4).

Los **sistemas de distribución de fármacos basados en el uso de nanopartículas** presentan importantes ventajas, como su **capacidad de llegar a prácticamente cualquier región del organismo** gracias a su **pequeño tamaño**, o la **posibilidad de dirigir las nanopartículas a zonas de interés mediante diferentes estrategias**, como por ejemplo la unión a ligandos específicos de tejido, lo que conlleva la **reducción de la cantidad de fármaco necesario para alcanzar una concentración terapéuticamente relevante** en el área de interés y la **reducción de los niveles de fármaco en otras regiones**, minimizando los posibles efectos secundarios. En cuanto a la vía de administración, la más frecuente es la intravenosa, ya que por el torrente sanguíneo las nanopartículas pueden llegar prácticamente a cualquier parte del organismo debido a que su tamaño es mucho menor que el diámetro de los capilares más estrechos (Okuhata, 1999).



Tabla I.4

Nanopartículas magnéticas		
<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
	Terapia	Diagnóstico
Detección	Administración de fármacos	RM
Separación de células	Hipertermia/ablación térmica	
Inmovilización enzimática	Radioterapia combinada con RM	
Inmunoensayos		
Transfección		
Purificación		

Tabla I.4. Algunas aplicaciones de las nanopartículas magnéticas en biomedicina (modificado de Tartaj et al., 2003).

3.1 Factores que influyen en la eficacia de los sistemas de distribución de fármacos basados en el uso de nanopartículas.

El factor limitante a la hora de utilizar estas estrategias es la dificultad para conseguir una dosis de fármaco terapéuticamente relevante en la zona de acción minimizando los efectos sobre otras regiones. Se pueden utilizar **dos tipos de estrategias a la hora de dirigir las nanopartículas** al sitio de interés: **pasivas o activas** (Arruebo et al., 2007). Las **estrategias pasivas** son el resultado de la **extravasación de las nanopartículas** a la región diana. Las nanopartículas **se acumulan con mayor facilidad en regiones inflamadas, infectadas o masas tumorales** debido a un proceso conocido como **permeabilidad y retención elevada (EPR, del inglés *enhanced permeability and retention*; Shenoy et al., 2005)**. La concentración de nanopartículas en estas regiones se debe a que en ellas suele estar **alterada la estructura vascular**, lo que **aumenta la permeabilidad**, y a una **disminución en el drenaje linfático** de la zona (Seymour, 1992). Las **estrategias activas** se basan en la **expresión exclusiva de ciertas proteínas en tejidos diana o en características físicoquímicas específicas de las nanopartículas**, como su naturaleza, el tamaño, la forma en que se une el fármaco a las nanopartículas, la funcionalización de las mismas, su hidrofobicidad o hidrofiliidad, y su respuesta ante factores como la temperatura, el pH, carga eléctrica o magnetismo (Arias et al., 2008). Entre estas características, **la más importante para determinar el destino de las nanopartículas en el organismo es el tamaño**, ya que cada tipo de vaso presenta distinta permeabilidad a las nanopartículas (Figura I.10).



Del tamaño de las nanopartículas depende también el **tiempo de residencia en sangre** de las mismas (Alexis et al., 2008).

Figura I.10

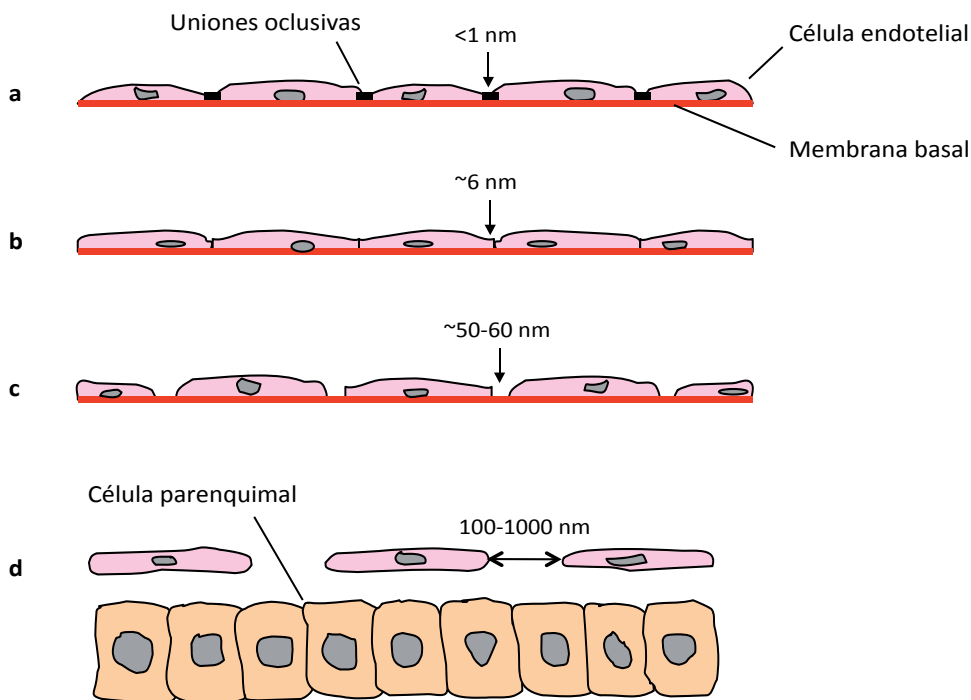


Figura I.10. Representación esquemática de los distintos tipos de capilares sanguíneos. a) Capilares con uniones oclusivas, como los que forman la barrera hematoencefálica. **b)** Capilares continuos, presentes en la mayor parte de los tejidos. **c)** Los capilares fenestrados pueden encontrarse en los riñones, intestino y algunas glándulas. **d)** Los capilares sinusoides se encuentran en el hígado, bazo y médula ósea. Los vasos que nutren a los tumores presentan fenestraciones que los hacen similares a este tipo de vasos (modificado de Okuhata, 1999; Krishnan, 2010)

3.2 Utilización de nanopartículas en terapia tumoral.

Los **tratamientos convencionales** del cáncer, como la **cirugía**, la **radioterapia** y la **quimioterapia** están limitados fundamentalmente por la **accesibilidad al tumor** y la **falta de selectividad hacia las células tumorales**. Por ello se están desarrollando nuevos sistemas que eviten estos problemas y ayuden a mejorar la eficacia de los tratamientos. Entre ellos, algunos de los más prometedores se basan en la **utilización de nanopartículas de distintos materiales** (revisado en Moghimi et al., 2001; Brigger et al., 2002; Fukumori e Ichikawa, 2006; Singh y Lillard, 2009; Chen et al., 2010).

En el caso de los tumores es especialmente importante el **efecto EPR**, ya que **los vasos que nutren los tumores son de mayor tamaño y más permeables** que los de los tejidos normales (Jang et al., 2003), debido a que presentan un **endotelio discontinuo**, con fenestraciones (Heuser y Miller, 1986). Las regiones tumorales presentan además un **retorno venoso más lento** que el



resto de tejidos y un **menor drenaje linfático** respecto a los tejidos normales e incluso a tejidos inflamados o infectados (Maeda et al., 2009). Esto sucede en la gran mayoría de tumores, aunque **la organización vascular puede depender del tipo de tumor, la tasa de crecimiento y su microambiente** (Hobbs et al., 1998). Existen numerosos estudios que demuestran la **acumulación pasiva de nanopartículas en los tumores sólidos tras la administración de las mismas por vía intravenosa** (Papahadjopoulos et al., 1991; Yuan et al., 1994; Parr et al., 1997; Drummond et al., 1999)

En varios ensayos preclínicos y clínicos se ha demostrado que **la unión de distintos fármacos antitumorales a nanopartículas de diversos tipos y materiales aumenta la eficacia del fármaco comparado con la administración de la misma dosis de fármaco libre** (Renoir et al., 2006; Li, 2009; Cao et al., 2010; Kim et al., 2010). Sin embargo, las estrategias pasivas pueden verse dificultadas por la generación de una **elevada presión intersticial en los tumores**, que tiende a ser mayor en la región central de los tumores sólidos, y disminuye hacia la periferia, generando un **movimiento de fluido desde el centro de la masa tumoral**, dificultando la permanencia de la droga en la región deseada durante un tiempo prolongado (Jain, 1989).

Para mejorar la eficacia de las nanopartículas como sistemas de distribución localizada de drogas se han desarrollado **estrategias activas para dirigir las nanopartículas** a la región de interés, como la **unión de las nanopartículas a ligandos específicos o anticuerpos** que las dirigen a un tipo de tejido concreto. Otra posibilidad es utilizar las **características específicas de las partículas y su respuesta frente a ciertos factores**. Una de las estrategias más prometedoras es la utilización de **nanopartículas magnéticas** que son guiadas hasta la región de interés gracias a la **aplicación de un gradiente de campo magnético**, de forma que las nanopartículas se dirigen a una región concreta y pueden además ser inmovilizadas en la zona durante el tiempo necesario.

3.3 Nanopartículas magnéticas.

El concepto de la utilización de **nanopartículas magnéticas como agentes transportadores que podrían dirigirse y concentrarse en una región concreta del organismo con ayuda de un campo magnético externo** fue propuesta por primer vez por Freeman en 1960 (revisado en Tartaj et al., 2003; Arruebo et al., 2007), y se basa en la **competición entre las fuerzas ejercidas sobre las partículas por el propio flujo sanguíneo y el campo magnético aplicado**. Cuando esta última supera a la primera las nanopartículas se retienen en la zona en la que se aplica el campo.

Para su utilización en biomedicina, especialmente cuando la aplicación se realiza *in vivo*, es importante que las nanopartículas presenten una serie de propiedades que las hagan



biocompatibles y eviten su toxicidad. Además de presentar las mismas características que el resto de nanopartículas diseñadas para uso biomédico, **las nanopartículas magnéticas deben poseer propiedades especiales para poder ser utilizadas en biomedicina, dependiendo de la aplicación que se quiera dar al material** (Tartaj et al., 2003). En el caso de las nanopartículas magnéticas, **sus características vienen determinadas por el núcleo de material magnético, y por la cubierta que rodea a ese núcleo.**

3.3.1 Núcleo magnético.

El material magnético debe proporcionar unos requerimientos esenciales, siendo el primero de ellos el **comportamiento superparamagnético**, que aparece en materiales de muy pequeño tamaño (ver **Anexo I**). **En los materiales paramagnéticos las fluctuaciones en la dirección de la magnetización afectan a los átomos que componen ese material de forma individualizada**, mientras que **en los materiales superparamagnéticos**, debido a su tamaño, **estas fluctuaciones afectan a la partícula entera**, que posee un único dominio magnético, y su comportamiento al aplicar un campo magnético es reversible. Si las partículas son de mayor tamaño su comportamiento magnético no será reversible, sino que presentará histéresis magnética. **Para uso biomédico es especialmente importante el superparamagnetismo**, ya que cuando el campo magnético deja de aplicarse, **el material no presenta una magnetización residual, de forma que no se produce la atracción y aglomeración entre partículas**, lo que evita posibles problemas como la embolización de los capilares sanguíneos. Otro requisito fundamental es que el **núcleo magnético sea biodegradable** o se pueda excretar fácilmente. Las nanopartículas con núcleos de hierro se procesan por las células utilizando las vías bioquímicas del metabolismo del hierro (Okon et al., 1994, Gutiérrez et al, 2006), mientras que otros tipos de núcleos no biodegradables deben ser cubiertos de materiales que permitan su eliminación (Bulte y Kraitichman, 2004). Finalmente, el núcleo magnético debe proporcionar una **alta magnetización**, para que el movimiento de las nanopartículas se pueda controlar con un campo magnético y se puedan inmovilizar en la región que se desee.

3.3.2 Cubierta de las nanopartículas magnéticas.

La cubierta de las nanopartículas les va a proporcionar características importantes para su uso. Recubrir las nanopartículas magnéticas con compuestos biocompatibles **evita su posible toxicidad, inmunogenicidad y permite aumentar el tiempo de residencia en sangre**. Por otra parte, la cubierta puede dotar a las nanopartículas de la **capacidad de unir determinados compuestos**, o les **proporciona carga superficial a pH fisiológico**, lo que permite su estabilización y evita que se formen agregados por la repulsión entre cargas del mismo signo.



4. Utilización de nanopartículas magnéticas como sistemas de distribución de drogas antitumorales.

Uno de los primeros trabajos en los que se utilizaron **nanopartículas magnéticas como agentes transportadores de fármacos antitumorales** se publicó en 1996, aplicándose este sistema en **modelos murinos de cáncer renal y de colon**. Los animales se trataron con **nanopartículas magnéticas cubiertas con anhidroglucosa y cargadas con epirrubicina**, con un **tamaño hidrodinámico de entre 50 y 150 nm**, y se produjo además la **embolización de los vasos aferentes a los tumores**, lo que condujo a una **rápida regresión en el tamaño tumoral** (Lübbe et al., 1996a). Los mismos autores llevaron a cabo un **ensayo clínico** en 14 pacientes con tumores sólidos avanzados utilizando el mismo tipo de **nanopartículas cargadas con epirrubicina**, obteniéndose un **retraso en el crecimiento tumoral** en algunos de ellos (Lübbe et al., 1996b). Posteriormente se han desarrollado diversos tipos de nanopartículas con diferentes cubiertas para su uso como sistemas de distribución de drogas con resultados variables. La utilización de **nanopartículas magnéticas cubiertas de polímeros de almidón y cargadas con mitoxantrona en conejos con cáncer de células escamosas ha conseguido eliminar con éxito este tipo de tumores** (Alexiou et al., 2000; Alexiou et al., 2003; Alexiou et al., 2007, Lyer et al., 2010). En estos estudios la aplicación de nanopartículas magnéticas de **100 nm de tamaño hidrodinámico** se realizó intraarterialmente en los vasos aferentes al tumor, lo que asegura la llegada de las nanopartículas al tejido tumoral. Sin embargo este método de administración puede presentar varias complicaciones dependiendo del tipo de tumor y su localización, ya que la accesibilidad al mismo puede ser muy limitada, lo que podría dificultar la administración del tratamiento. Recientemente se han utilizado **nanopartículas magnéticas cubiertas con folato como sistema transportador de doxiciplina en ratas y conejos con cáncer hepático, produciendo una reducción significativa del tamaño tumoral** (Maeng et al., 2010), si bien en este caso las nanopartículas no se dirigieron al área de interés sólo mediante un campo magnético, sino también por la interacción entre el folato y su receptor expresado en las células tumorales. Aunque existen diversas complicaciones, los resultados obtenidos en estos estudios animan a seguir desarrollando nuevos métodos de distribución para el transporte de diversos fármacos antitumorales.

5. Modelos murinos de cáncer para experimentación.

El ratón es el animal de experimentación más utilizado para generar modelos que replican **enfermedades neoplásicas humanas**. Estos animales ofrecen muchas ventajas con respecto a otros modelos animales de experimentación (Benavides y Guenet, 2000). Muchos de los **procesos bioquímicos de estos animales son similares a los humanos**, tienen un **tiempo generacional muy corto** y se adaptan fácilmente a diferentes condiciones, lo que permite



controlar las variables ambientales experimentales, y existen una **gran cantidad de líneas definidas con distintas características**.

La mayoría de los modelos experimentales se basan en la generación de **ratones modificados genéticamente, el uso de líneas celulares tumorales humanas o murinas, o de carcinógenos** (Ding et al., 2010). La **modificación genética** de ratones genera modelos de gran utilidad para estudiar los mecanismos implicados en el **proceso de transformación celular y las etapas iniciales del desarrollo tumoral**. Sin embargo su utilidad ha resultado menor para el estudio de las etapas más tardías en el cáncer avanzado (Céspedes et al., 2006), y por tanto no se consideran la mejor opción a la hora de validar la eficacia de nuevos tratamientos antitumorales. Los **xenotransplantes de tumores o líneas celulares tumorales humanas en ratones inmunodeficientes** reproducen mejor la **histología y el patrón metastásico** de los tumores humanos en estado avanzado (Céspedes et al., 2006), pero no permiten el estudio de los procesos que implican la participación de distintos componentes celulares o moleculares del sistema inmune que influyen en el desarrollo de los tumores. Para este fin los modelos más apropiados son los basados en el uso de **líneas celulares tumorales singénicas** (Talmadge et al., 2007), que al ser utilizadas en ratones del mismo fondo genético evitan el rechazo inmunológico y pueden utilizarse en animales inmunocompetentes, **permitiendo el estudio de la respuesta inmune antitumoral en el cáncer avanzado**. Por último, los modelos basados en la **utilización de carcinógenos** proporcionan la posibilidad de estudiar el **proceso de desarrollo tumoral completo**, permiten un **crecimiento ortotópico** del tumor y **reproducen la histología y los procesos metastásicos** propios de cada tipo tumoral mejor que los tumores transplantados (Talmadge et al., 2007). A pesar de estas ventajas este tipo de modelos no se utilizan con mucha frecuencia debido fundamentalmente al largo tiempo que conlleva el desarrollo de estos tumores.

Teniendo en cuenta los precedentes estudiados, y con el fin de desarrollar nuevos sistemas terapéuticos eficaces contra el desarrollo de tumores, evitando los efectos secundarios que estos pudieran generar, en este trabajo **se propone el uso de nanopartículas magnéticas como método de distribución de IFN- γ para el tratamiento de tumores mediante la activación de los procesos de inmunovigilancia tumoral, y su análisis en modelos murinos de cáncer basados en la inyección de líneas singénicas y la inducción química de tumores**, y para alcanzar estos fines se proponen los siguientes objetivos.

No podemos engañar a la naturaleza, pero sí podemos ponernos de acuerdo con ella.

Albert Einstein



Objetivos



1. Determinar si es posible conseguir la interacción entre el IFN- γ y las nanopartículas magnéticas, y estudiar qué factores afectan a este proceso.
2. Analizar la interacción entre las nanopartículas y las células tumorales Pan02 *in vitro*, y los posibles efectos citotóxicos que aquéllas pudieran tener.
3. Comprobar la toxicidad y biodistribución de las nanopartículas *in vivo*, y si ésta varía al aplicar un campo magnético externo.
4. Analizar la eficacia de este sistema de administración y distribución controlada de IFN- γ y sus efectos en tumores sólidos establecidos en modelos murinos.
 - a. En un modelo generado por inyección de células tumorales singénicas (Pan02).
 - b. En un modelo generado por inducción química de tumores.

En el fondo los científicos somos gente con suerte: Podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smolin



Materialles y Métodos



1. Cepas de ratones.

Se han utilizado ratones C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas de edad, tanto hembras como machos, procedentes de Harlan Laboratories y mantenidos en condiciones libres de patógenos en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología. Todos los procedimientos realizados en esta tesis que conllevan el manejo de animales se rigen por la legislación de la Unión Europea y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro Nacional de Biotecnología (CEEACNB).

2. Líneas celulares.

La línea celular murina Pan02, procedente de adenocarcinoma ductal de páncreas de fondo genético C57BL/6 se cultivó en medio DMEM (BioWhittaker) suplementado con 10% FBS (LifeScience), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato sódico (todos de Sigma), y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad relativa).

3. Nanopartículas magnéticas.

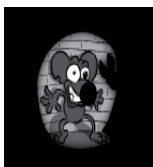
Todas las muestras de nanopartículas utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por la Dra. María del Puerto Morales y el Dr. Sabino Veintemillas (Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, CSIC, Madrid). Las características físico-químicas de los distintos tipos de nanopartículas utilizados se recogen en la siguiente tabla:

Muestra	Método de síntesis	D _{TEM} (nm)	Recubrimiento	% Recubrimiento	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial ζ (mV) a pH 7
NDEX	Coprecipitación	6	Aminodextrano	22	160	+26
DEX		7	Dextrano	14	100	-17
DMSA	Descomposición en medio orgánico	9	Ácido dimercaptosuccínico	24	90	-40
PPA	Láser-pirólisis	10	Ácido fosfonoacético	25	80	-45
CIT		10	Ácido cítrico	18	80	-38
CDEX		10	Carboxidextrano	34	100	-36

Ver **Anexo I** para detalles sobre síntesis, estabilización y caracterización coloidal de nanopartículas.

4. Proceso de adsorción/liberación entre el IFN- γ y las nanopartículas magnéticas.

El IFN- γ es una proteína formada por dos subunidades idénticas de entre 21 y 24 kDa dependiendo de su grado de glicosilación. Su punto isoelectrico está en torno a 8,1, por lo que



a pH fisiológico presenta carga positiva. Por este motivo fue necesario utilizar nanopartículas cargadas negativamente en su superficie para poder adsorber el IFN- γ mediante una interacción electrostática. Para analizar la eficacia del proceso de adsorción se añadieron nanopartículas en exceso (300 $\mu\text{g/ml}$) al medio de interacción, que contenía IFN- γ murino (PeproTech) a una concentración de 2 ng/ml, y se incubaron durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente (RT). Las nanopartículas se separaron mediante el uso de imanes y se recogió el sobrenadante para su análisis (IFN- γ no unido). Las nanopartículas se resuspendieron en el mismo medio usado anteriormente más 1% de BSA (seroalbúmina bovina; Calbiochem), se lavaron durante 30 minutos en agitación, y se separaron mediante imanes para obtener nuevos sobrenadantes (IFN- γ lavado). Para determinar los parámetros que influyen en la ruptura de la interacción entre la citoquina y las nanopartículas, los conjugados se resuspendieron en medio de liberación, se incubaron, se separaron mediante imanes y se recogieron los sobrenadantes (IFN- γ liberado) para analizarlos junto con los anteriores.

El análisis de los parámetros que influyen en el proceso de interacción se realizó utilizando una muestra de nanopartículas de baja carga negativa superficial (DEX) y otra de mayor carga negativa (DMSA). Los parámetros que se analizaron fueron la fuerza iónica del medio de interacción (PBS (Roche), NaCl 0,9% o NaCl 0,5%, todos a pH 7), el tiempo de incubación (de 30 a 180 minutos, a intervalos de 30 minutos), el pH del medio (entre 5,5 y 9 a intervalos de 0,5 unidades, conseguidos añadiendo HCl o NaOH (ambos de Merck) al medio), el tiempo necesario para la ruptura de la interacción (1, 2, 3, 5 ó 20 horas), la influencia de la temperatura en el proceso de liberación (RT o 37°C) y la cantidad de nanopartículas presentes en el medio (utilizadas a 3 mg/ml). Una vez establecidos los parámetros adecuados se analizó la influencia de la cubierta de las nanopartículas magnéticas en el proceso de interacción.

5. ELISA.

Para la detección de IFN- γ mediante ELISA se utilizó el Mouse IFN- γ ELISA Set (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. El revelado se realizó con el OptEIA TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences).

6. Western blot.

Para la detección de IFN- γ mediante *Western blot* se añadió tampón de ruptura (250 mM Tris-HCl (Merck) pH 6,8, 10% SDS (Sigma), 30% glicerol (Merck), 5% β -mercaptoetanol (Sigma), 0,02% azul de bromofenol (Sigma)) a 50 μl de muestra. Las muestras se hirvieron durante 3 minutos y se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS/PAGE; sistema BioRad). Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (BioRad). Las membranas se bloquearon en una solución de



leche al 5% en PBS (Roche) 0,1% Tween 20 (Merck), durante 1 hora, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a las membranas. Tras el bloqueo las membranas se incubaron en una solución de 0,5% leche en PBS (Roche) 0,1% Tween 20 (Merck) que contenía el anticuerpo primario *rabbit anti-mouse* IFN- γ (PeproTech) diluido 1/1000. Como anticuerpo secundario *goat anti-rabbit-HRP* (Dako) diluido de la misma manera. El revelado se realizó con ECL (Amersham Bioscience).

7. Ensayo funcional de IFN- γ .

Se obtuvieron macrófagos murinos mediante la inyección intraperitoneal de 1 ml de caseína (Sigma) al 9% p/v en PBS (Roche), en ratones C57BL/6. Tras 24 horas se recogieron los macrófagos mediante lavado peritoneal con PBS frío en condiciones estériles, se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos, se resuspendieron en medio RPMI-1460 (BioWhittaker) suplementado con 10% de FBS (LifeScience), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico y 50 μ M de β -mercaptoetanol (todos de Sigma), y se cultivaron en placas de 6 pocillos (2×10^5 células por pocillo en 3 ml de medio) en condiciones estándar de cultivo. Tras 24 horas las células se lavaron con PBS y se añadieron diferentes tratamientos, todos en RPMI-1460 (BioWhittaker) completo: 10 ng/ml (100 UI/ml) de IFN- γ comercial (PeproTech) soluble como control positivo, 10 ng/ml (100 UI/ml) de IFN- γ unido a nanopartículas magnéticas cubiertas de DMSA o 10 ng/ml (100 UI/ml) de IFN- γ liberado de las nanopartículas. Se utilizaron además macrófagos sin tratar como control negativo. Tras 24 horas de incubación las células se lavaron con PBS, se recogieron, se marcaron con un anticuerpo anti-CD40-PE (BD Pharmingen) diluido 1/100 en PBS (Roche) 2mM EDTA (Sigma) 2% FBS (LifeScience), y se analizaron mediante citometría de flujo.

8. Caracterización del tamaño hidrodinámico y el potencial Z de las DMSA-NP y las IFN- γ -DMSA-NP.

La caracterización coloidal de las suspensiones se llevó a cabo por dispersión dinámica de luz (DLS) con un equipo Nano Sizer ZS (Malvern Instruments). Se prepararon suspensiones estables de las partículas en agua (solas o unidas a IFN- γ) a una concentración aproximada de 0,5 mM de Fe. El diámetro hidrodinámico se midió en modo intensidad (intensidad de luz dispersada en función del tamaño hidrodinámico). Para medir la carga superficial se aplicó una diferencia de potencial a la suspensión y se midió la movilidad electroforética de las nanopartículas, que depende de su carga, en función del pH. Para realizar esta medida se añadió KNO_3 (Merck) 0,01 M para asegurar una fuerza iónica constante con el cambio del pH, y los cambios de pH se realizaron añadiendo cantidades crecientes de HNO_3 o KOH (ambos de Merck).



9. Tinción celular para la detección de hierro.

La tinción de Azul de Prusia produce una intensa coloración azul en las zonas donde se acumula hierro. Esto permite comprobar si las nanopartículas se internalizan en las células y cuál es su distribución celular.

Las células cultivadas solas, en presencia de nanopartículas cubiertas de DMSA (0,5 mg Fe/ml) o en presencia de nanopartículas cubiertas de DMSA y cargadas con IFN- γ (0,5 mg Fe/ml con 10000 UI/ml de IFN- γ) durante 24 horas, se fijaron en metanol (Merck) frío durante 3 minutos y se dejaron secar al aire. Se preparó una mezcla de ferrocianuro potásico (Sigma) al 4% y HCl (Merck) al 4% en proporción 1:1, y se tiñeron las células durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron 2 veces con agua destilada y se contratiñeron con rojo neutro (Sigma) al 0,5% durante 2 minutos, se lavaron de nuevo con agua destilada, se dejaron secar al aire y las muestras se montaron con DePeX (Serva) para su observación al microscopio en campo claro.

10. Medida de la cantidad de hierro internalizado por las células.

Con el fin de determinar la cantidad de nanopartículas captadas por las células en cultivo se utilizó un método colorimétrico de detección de hierro, basado en la presencia de ferrozina, que forma complejos con iones Fe^{2+} , que absorben la luz a 550 nm ([Riemer et al., 2004](#)). Para realizar esta determinación se incubaron 10^5 células Pan02/pocillo en placas de 24 pocillos. Las células se incubaron solas, en presencia de nanopartículas cubiertas con DMSA (0,5 mg/ml) o en presencia de nanopartículas cubiertas con DMSA a las que previamente se adsorbió IFN- γ (0,5 mg/ml + 15000 UI/ml IFN- γ) durante 24 horas. Pasado el periodo de incubación las células se lavaron 3 veces con solución de lavado (PBS 150 mM NaCl frío) durante 3 minutos, se retiró toda la solución de lavado y se congelaron las células en las placas a -20°C durante 1 hora. Pasado este tiempo se lisaron las células con 500 μl /pocillo de NaOH (Merck) 50 mM y se mantuvieron las placas en agitación durante 2 horas, se recogieron las alícuotas en tubos eppendorf y se mezclaron con 500 μl de HCl (Merck) 10 mM y 500 μl de una mezcla 1:1 en volumen de HCl (Merck) 1,4 M y de una solución 4,5% p/v de KMnO_4 (Merck) en agua. Este tratamiento permite liberar el hierro que haya podido asociarse a proteínas como la ferritina. Las muestras se incubaron durante 2 horas en un baño de agua a 60°C , se extrajeron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 150 μl de la solución de detección (ferrocina 6,5 mM (Sigma), neocuprina 6,5 mM (Sigma), acetato amónico 2,5 M (Panreac) y ácido ascórbico 1 M (Sigma) en agua) a cada muestra y se incubaron durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 550 nm de longitud de onda de cada muestra y de unos patrones preparados de la misma manera, que contenían cantidades de Fe conocidas, y se determinó la cantidad de hierro presente en cada muestra.



11. Localización intracelular de las nanopartículas.

Para determinar la localización intracelular de las DMSA-NP en las células Pan02, éstas se incubaron con nanopartículas cubiertas de DMSA (0,5 mg Fe/ml) durante 24 horas, y posteriormente se marcaron con 50 nM LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes) en medio de cultivo a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente las células se lavaron con PBS (Roche), se fijaron con paraformaldehído (Sigma) 4%, se volvieron a lavar y las muestras se montaron con Prolong (Molecular Probes) para su observación mediante microscopía de campo claro y de fluorescencia.

12. Ensayos de citotoxicidad con MTT.

El MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 dimetiltetrazolio) es un compuesto de color amarillo, que en las células vivas se reduce a formazán, de color púrpura, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (Figura M.1). Gracias a este método podemos determinar la cantidad de células vivas en un cultivo.

Figura M.1

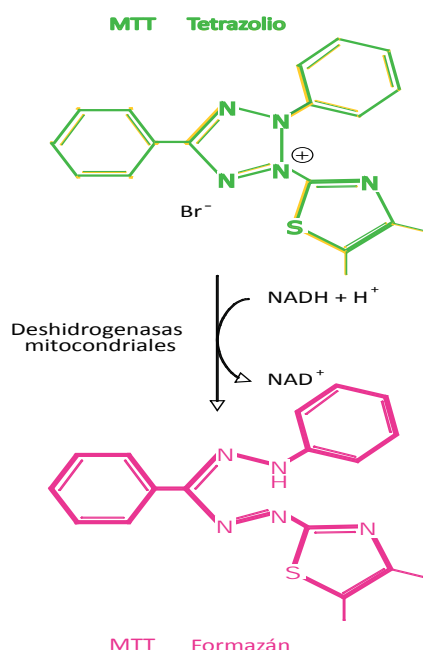


Figura M.1. Reacción producida en el ensayo MTT. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas reducen el MTT, de forma que el anillo de tetrazolio se rompe, dando lugar a una sal de formazán.

Las células se incubaron en placas multipocillo P24, solas, en presencia de nanopartículas cubiertas de DMSA (0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml o 0,5 mg/ml), de este mismo tipo de nanopartículas cargadas con IFN- γ (0,5 mg/ml + 15000 UI/ml IFN- γ), o de IFN- γ soluble (15000 UI/ml) durante 24 horas. Tras otras 24 horas de cultivo, se lavaron con PBS y se añadieron 0,5 ml/pocillo de MTT (Sigma) a una concentración de 0,5 μ g/ml en medio completo. Tras tres horas,



los precipitados de formazán presentes en los pocillos se disolvieron con 0,5 ml/pocillo de DMSO (dimetilsulfóxido; Sigma), y se midió la densidad óptica (D.O.) a 570 nm. El porcentaje de supervivencia celular se representó como una relación entre la densidad óptica de las células incubadas con nanopartículas y la densidad óptica de las células control:

$$\% \text{Supervivencia} = \frac{D.O._{\text{Célula NP}}}{D.O._{\text{Célula CONTROL}}} \times 100$$

13. Ensayos de citotoxicidad con AlamarBlue.

El compuesto comercial AlamarBlue se utiliza como indicador de la supervivencia celular de múltiples líneas celulares en cultivo. El ingrediente activo de AlamarBlue, la resazurina, es un compuesto no tóxico de color azul y no fluorescente, que al entrar en las células es reducido por las enzimas mitocondriales, dando lugar a resorufina, de color rojo y altamente fluorescente (Figura M.2). Esto permite determinar la supervivencia celular en un cultivo.

Figura M.2

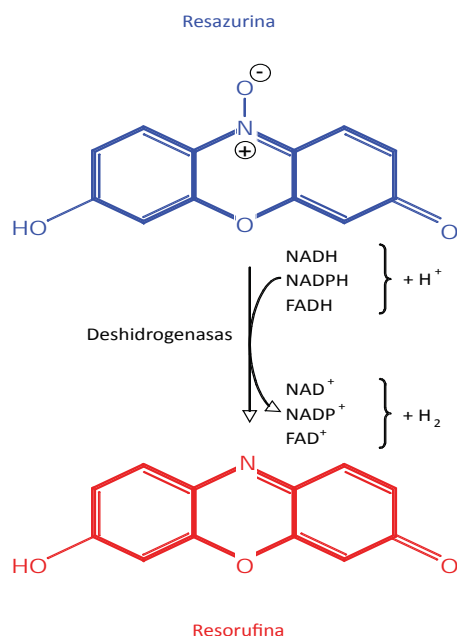


Figura M.2. Reacción producida en el ensayo AlamarBlue. La resazurina actúa como aceptor de electrones de las deshidrogenasas en las células vivas, convirtiéndose en resorufina, compuesto de color rojo y altamente fluorescente.

Las células se incubaron en placas de 96 pocillos, solas, en presencia de nanopartículas cubiertas de DMSA (0,5 mg/ml), de este mismo tipo de nanopartículas cargadas con IFN- γ (0,5 mg/ml + 10000 UI/ml IFN- γ), o de IFN- γ soluble (10000 UI/ml), en un volumen final de 200 μ l/pocillo, durante 24 horas. Una vez cumplido este tiempo se añadieron 20 μ l de AlamarBlue (Invitrogen)



a cada pocillo y se incubaron 4 horas. Posteriormente se midió la fluorescencia en un Cytofluor 2350, con un filtro de excitación de 530 nm y un filtro de emisión de 590 nm. El porcentaje de supervivencia celular se representó como una relación entre la fluorescencia de las células incubadas con nanopartículas y la fluorescencia de las células control:

$$\%Supervivencia = \frac{Fluorescencia_{C\acute{e}lNP}}{Fluorescencia_{C\acute{e}lCONTROL}} \times 100$$

14. Inmunocitoquímica.

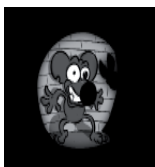
Las células Pan02 se cultivaron solas o en presencia de nanopartículas cubiertas de DMSA durante 24 horas y posteriormente se fijaron en metanol (Merck) frío o paraformaldehído (Sigma) 4% durante 5 minutos, se lavaron 3 veces con PBS, se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton x-100 (Sigma) y se añadió un anticuerpo anti- α -tubulina-FITC (1/50, Sigma) o faloidina-TRITC (1/1000, Sigma), ambos diluidos en PBS 10% FBS, durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Tras la incubación, las células se lavaron con 3 veces con PBS y se contratiñeron con Hoechst 33258 (0,05 mg/ml en agua destilada (Sigma), 3 minutos). Finalmente se lavaron con agua destilada y se montaron con Prolong (Molecular Probes). La fluorescencia se observó en un microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara digital Olympus DP50.

15. Medidas de magnetización.

Para comprobar la cantidad de nanopartículas presentes en distintos tejidos extraídos de los ratones se realizaron dos tipos de medidas:

15.1 Curvas de imanación.

Las curvas de imanación representan la respuesta de magnetización de una muestra al aplicar un campo magnético a temperatura ambiente. Para ello, tras la extracción del tejido, este se liofilizó y se pesó. El sólido se compactó en una pastilla y se midió su imanación en función del campo aplicado. Las medidas se realizaron con un magnetómetro SQUID (Superconductor Quantum Interference Device) en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid y el Departamento de Física Fundamental de la Universidad de Barcelona. Este tipo de medidas permite conocer el valor de la magnetización de saturación (M_s), que es el valor de la magnetización cuando todos los momentos magnéticos se encuentran alineados con el campo magnético externo aplicado. M_s es una propiedad intrínseca del material, por lo que conociendo la M_s de una mezcla podemos saber el porcentaje de material magnético presente en la misma.



15.2 Susceptibilidad magnética AC (*Alternating Current*).

Se han realizado medidas de susceptibilidad AC de tejidos extraídos de ratones que recibieron inyecciones de PBS como control, nanopartículas cubiertas con DMSA e IFN- γ unido a nanopartículas cubiertas con DMSA con y sin aplicación de campo magnético externo. Las muestras de tejido fueron liofilizadas y trituradas. El sólido resultante se compactó en una cápsula de gelatina para las medidas magnéticas. Las medidas se realizaron en un magnetómetro SQUID con opción de medidas AC (Universidad de Zaragoza). Se ha medido la susceptibilidad AC entre 1.8 y 300 K de temperatura. La amplitud del campo alterno ha sido en todos los casos de 4.5 Oe y la frecuencia de 1Hz. Este tipo de medidas permite diferenciar los distintos tipos de material magnético presente en una muestra, de forma que podemos distinguir la respuesta producida por las nanopartículas acumuladas en los tejidos extraídos de los distintos grupos de tratamiento y la que se debe a otros componentes magnéticos que pueda contener el tejido (ferritina).

16. Aplicación de campos magnéticos.

Con el fin de poder analizar la eficacia de las nanopartículas magnéticas como vehículos de administración de citoquinas a una región considerada de interés, se diseñaron dos modelos de aplicación de campos magnéticos: un modelo de implantación quirúrgica subcutánea de imanes en ratones C57BL/6, y un modelo no invasivo de aplicación de campos magnéticos externos.

16.1 Implantación quirúrgica de dispositivos magnéticos.

Tras ser rasurados, los animales se introdujeron en la cámara de inducción de un circuito anestésico vaporizador y se les suministró isoflurano (4%; Inibsa) vehiculizado en oxígeno (0,5 l/min). Una vez que los animales perdieron la consciencia se extrajeron de la cámara y se les colocó una mascarilla por la que se les suministró el mismo anestésico a una concentración menor (0,5%) vehiculizado de la misma manera. Los animales se colocaron en decúbito prono sobre una almohadilla térmica a 37°C para evitar la hipotermia, se aseptizó la piel del flanco derecho y se realizó una pequeña incisión de 7 mm de longitud junto a la articulación coxo-femoral derecha. Por esta incisión se introdujo un imán de campo abierto de 0,2 Tesla, con ayuda de unas pinzas antimagnéticas (FST). Los imanes utilizados son de Neodimio/Hierro/Boro cubiertos por oro, oro y teflón (ambos de Alman GZ) o de Neodimio/Hierro/Boro cubiertos por una doble cofia de acero quirúrgico sellado por láser (Dyna Dental Ibérica), con unas dimensiones de 5 mm de diámetro y 1,8 mm de grosor. Una vez colocado el imán en la región de interés se procedió al cierre de la herida, utilizando para ello sutura no absorbible de tipo 6/0 y agujas curvas (Aragó). Tras este proceso se retiró el suministro de isoflurano y se observó el estado de los ratones hasta su completa recuperación de la anestesia. Durante el



periodo postoperatorio se administró un tratamiento analgésico con Buprenorfina 0,1 mg/kg (Reckitt Benckiser Healthcare) por vía subcutánea durante 3 días, y Paracetamol 0,1 mg/ml (Cinfa) en agua por vía oral durante 7 días. Durante este periodo se comprobó a diario el estado general de los animales, su peso y el aspecto de la herida hasta el cierre completo de la misma.

16.2 Aplicación de un campo magnético externo.

Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (Merial; 121 µg/g) y xilacina (Calier; 14 µg/g). Una vez inconscientes, se sometieron a un campo magnético externo mediante la aplicación directa sobre la zona a tratar de imanes de campo abierto de 0,4 Tesla, compuestos por Neodimio/Hierro/Boro y unas dimensiones de 5 mm de diámetro y 5 mm de grosor (Aiman GZ).

17. Inducción de tumores subcutáneos con células tumorales singénicas.

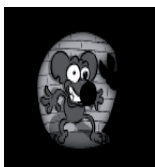
Para la generación de tumores subcutáneos se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células Pan02 resuspendidas en PBS, en un volumen de 100 µl, en el flanco derecho de un grupo de ratones. Tras una semana los tumores en desarrollo se hicieron claramente visibles y se monitorizó su crecimiento dos veces por semana, midiendo su anchura (x) y longitud (y) con un calibre, y calculando el volumen tumoral en base a la fórmula $(x^2 \times y)/2$. Una semana después de la inoculación de las células tumorales se comenzó el tratamiento.

18. Inducción química de fibrosarcomas.

Se inyectó en la región subcutánea del flanco derecho de un grupo de ratones una única dosis de 0,15 mg de 3-Metilcolantreno (Sigma-Aldrich) disuelto en aceite de maíz (Sigma-Aldrich). Se monitorizó la aparición de tumores 2 veces a la semana hasta que estos fueron claramente visibles. A partir de ese punto se monitorizaron diariamente hasta que alcanzaron un volumen de 300 mm³, momento en el cual se comenzó el tratamiento.

19. Administración de los tratamientos.

Una vez aplicado el imán en la superficie a tratar, se administraron los tratamientos por vía intravenosa. Se establecieron distintos grupos de tratamiento, que recibieron PBS (grupo control), IFN-γ (10000 UI), nanopartículas cubiertas de DMSA (300 µg) o IFN-γ unido a ese tipo de nanopartículas (10000 UI IFN-γ + 300 µg nanopartículas). Este último tratamiento se administró también a un grupo de ratones a los que no se aplicó campo magnético. En los casos en los que se aplicó un campo magnético externo, este se mantuvo durante 1 hora y se vigiló el estado de los animales hasta su completa recuperación de la anestesia. El tratamiento se administró dos veces por semana durante dos semanas, y el tamaño tumoral se monitorizó en



cada sesión de tratamiento con un calibre. Una hora después de administrar la última dosis de tratamiento, se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores para su análisis.

20. Medida de los niveles de IFN- γ en suero y en el ambiente tumoral.

Tras la última sesión de tratamiento se recogieron muestras de sangre de los ratones, se sacrificaron y se extrajeron los tumores. Las muestras de sangre se mantuvieron a RT durante 4 horas, se centrifugaron a 300 x g durante 30 minutos y se recogió el suero para su análisis mediante ELISA. Los tumores, una vez extraídos, se cortaron en pequeños fragmentos y se cultivaron durante 24 horas en placas multipocillo P24, añadiendo 1 ml/pocillo de medio RPMI-1460 (BioWhittaker) suplementado con 10% de FBS (LifeScience), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico y 50 μ M de β -mercaptoetanol (todos de Sigma). Pasado el tiempo de incubación se recogió el medio condicionado por las células para su análisis junto con las muestras de suero.

21. Fijación e inclusión de tejidos en parafina.

Los tejidos a analizar se fijaron en paraformaldehído (Sigma) al 4% en PBS durante 16 horas a 4°C. Pasado este tiempo se lavaron varias veces con PBS 0,001% Tween 20. El tejido se deshidrató mediante lavados en soluciones de etanol (Merck) de concentración creciente, y finalmente en xileno (Merck), y se incluyeron en bloques de parafina. Por último se realizaron cortes histológicos de 7 μ m de grosor para su posterior tinción y análisis.

22. Congelación de tejidos.

Inmediatamente tras su extracción los tejidos se introdujeron en soluciones de sacarosa de concentración creciente, se incluyeron en medio de congelación (Jung), se congelaron y mantuvieron a -80°C. Finalmente se realizaron cortes histológicos en criostato (8 μ m) para su uso análisis mediante inmunohistoquímica.

23. Tinción histológica para la detección de hierro.

Las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron sumergiéndolas primero en xileno (Merck) y posteriormente en soluciones de etanol (Merck) de concentración decreciente, hasta realizar un lavado final con agua destilada. Se preparó una mezcla de ferrocianuro potásico (Sigma) al 10% y HCl (Merck) al 10% en proporción 1:1, y se tiñeron los cortes durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron 2 veces con agua destilada y se contratiñeron con rojo neutro (Sigma) al 0,5% durante 5 minutos, se lavaron de nuevo con agua destilada, se dejaron secar al aire y se montaron con DePeX (Serva) para su observación al microscopio.



24. Inmunohistoquímica.

Los cortes seriados de tejidos congelados se fijaron en acetona fría, se lavaron y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con una solución inhibidora (Dako). Tras este bloqueo se lavaron en TBS y se añadieron los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en PBS (Roche) 2,5% FCS (LifeScience) 0,5% BSA (Calbiochem), se incubaron durante 1 hora y se lavaron de nuevo. A continuación se añadió el reactivo EnVision + System HRP (Dako) o Histofine Simple Stain (Nichirei), y se mantuvieron durante 30 minutos. El revelado se realizó con el AEC Substrate Chromogen Solution (Dako) durante 15 minutos y la contratinción se realizó con hematoxilina (Sigma Aldrich) durante 5 minutos. Los cortes se lavaron con agua corriente durante 10 minutos y se montaron con Fluoromount G (Southern Biotech).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-CD3 (Dako), anti-Ly49G2 (4D11, eBioscience), anti-LAMP2 (M3/84, Santa Cruz), anti-Anexina-V (Abcam) todos diluidos 1/100, y anti-CD31 (MEC13.3, BD Pharmingen) diluido 1/200.

25. Cuantificación y análisis estadístico.

La cuantificación de bandas obtenidas por *western blot* y de las áreas teñidas en inmunohistoquímica y tinciones de azul de Prusia, se realizó utilizando el software ImageJ. Se analizaron un mínimo de 50 cortes representativos, procedentes de al menos 5 tumores distintos. Los datos se han representado como la media \pm D.E. (desviación estándar). Se ha aplicado el test t de Student para comparar los datos, considerando las diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ y altamente significativas cuando $p < 0,001$.

Soy de las que piensan que la Ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie



Resultados



1. Interacción entre el IFN- γ y las nanopartículas magnéticas.

La interacción más sencilla que puede producirse entre las nanopartículas y una proteína es la atracción entre cargas de signo contrario. Existen numerosos estudios que indican que las nanopartículas pueden adsorber de forma espontánea distintos tipos de moléculas cargadas (Kingsley et al., 2006; Cai et al., 2008; Seagrave, 2008), y que estas interacciones dependen de las propiedades del medio y de las nanopartículas a las que se une la molécula de interés (Arias et al., 2008; Gaihre et al., 2009). El IFN- γ murino presenta carga positiva a pH fisiológico, por lo que fue necesario utilizar nanopartículas magnéticas con carga negativa en superficie para conseguir la interacción que permitiera la posterior administración localizada de la citoquina. En este trabajo hemos analizado los distintos aspectos que pueden influir en la interacción electrostática entre las nanopartículas magnéticas y el IFN- γ o su posterior liberación, y la funcionalidad de éste tras el proceso de adsorción.

Figura R.1

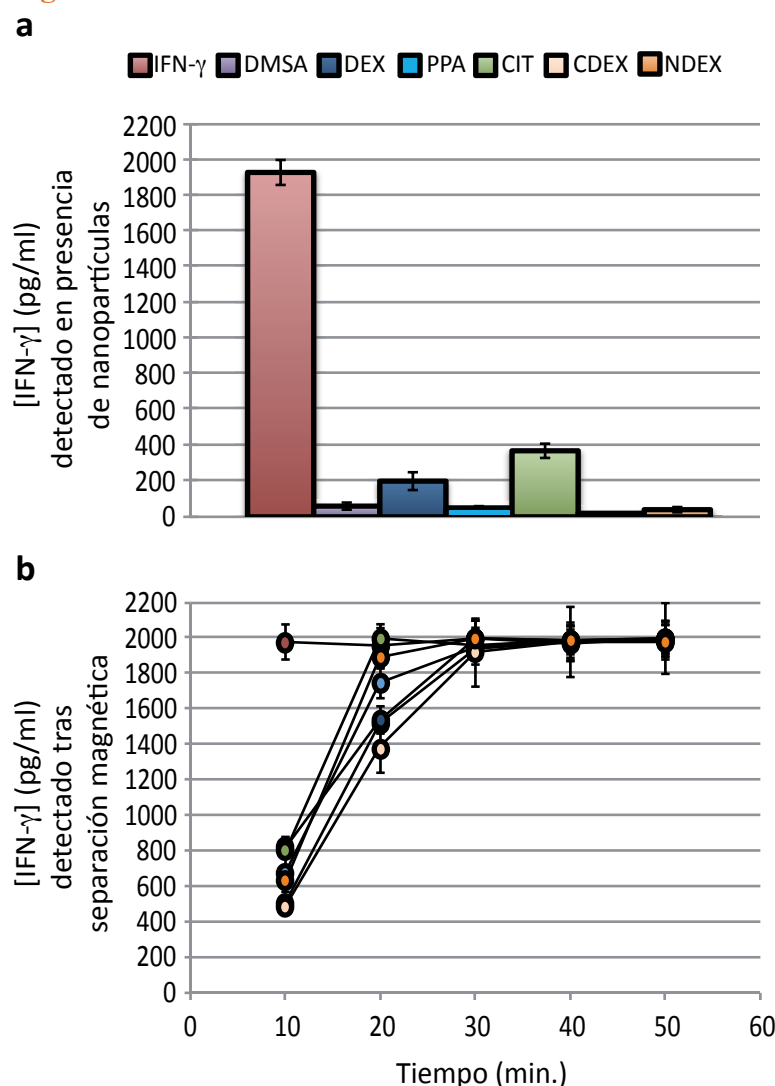


Figura R.1. Detección de IFN- γ mediante ELISA en presencia de distintos tipos de nanopartículas y determinación del tiempo óptimo de separación magnética. a)

Se añadieron distintos tipos de nanopartículas magnéticas (300 μ g Fe/ ml) a una solución de 2 ng/ml de IFN- γ en PBS. La presencia de cualquiera de los tipos de nanopartículas en las muestras a analizar interfirió en la detección de IFN- γ . **b)** La mezcla de IFN- γ y nanopartículas se sometió a un campo magnético durante distintos periodos de tiempo con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de nanopartículas de las muestras a analizar mediante ELISA. En a y b, los datos representan las medias \pm D.E. de los resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado. IFN- γ , control con IFN- γ sin nanopartículas; DMSA, ácido dimercaptosuccínico; DEX, dextrano; PPA, ácido fosfonoacético; CIT, citrato; CDEX, carboxidextrano; NDEX, aminodextrano.



1.1 La presencia de nanopartículas magnéticas en el medio de ensayo interfiere con la detección de IFN- γ mediante ELISA.

Los niveles de IFN- γ detectado mediante ELISA en presencia de los distintos tipos de nanopartículas utilizadas en este trabajo fueron menores que la cantidad de citoquina presente en el medio (Figura R.1a), que sí pudo detectarse en el control utilizado sin nanopartículas magnéticas. Este resultado puso de manifiesto la necesidad de realizar una separación magnética de las nanopartículas durante un tiempo suficiente para eliminar la mayor parte posible de ellas de las muestras a analizar. Para determinar el mínimo tiempo necesario de separación magnética se analizaron distintas muestras que contenían la misma cantidad de IFN- γ y de nanopartículas y se sometieron a distintos tiempos de separación. Se consideró óptimo el tiempo más corto con el que se obtuvo una medida real del nivel de IFN- γ presente en la muestra para todos los tipos de nanopartículas (Figura R.1b), que fue de 30 minutos. Dado este resultado, la medida del IFN- γ unido a las nanopartículas no se pudo realizar directamente en ningún caso, sino que fue necesario medir la cantidad de IFN- γ no unido (presente tras la separación magnética en el medio en el que se produjo la interacción), perdido en los lavados de las nanopartículas tras la interacción inicial (presente tras la separación magnética en el medio de lavado) o liberado de las nanopartículas.

1.2 Efecto de la fuerza iónica del medio en el proceso de adsorción.

Debido a que la interacción entre las nanopartículas magnéticas y el IFN- γ se basa en la atracción electrostática entre cargas de signo contrario, la fuerza iónica del medio es uno de los parámetros que más pueden afectar a la adsorción, ya que los iones del medio se estructuran alrededor de las cargas libres de la proteína y de la superficie de las nanopartículas, dificultando la interacción. Para analizar el efecto de la fuerza iónica y otras propiedades físico-químicas del medio de las que hablaremos en los siguientes apartados, se utilizaron dos tipos de nanopartículas distintas, una con carga superficial negativa débil (DEX) y otra de mayor carga negativa (DMSA), ambas se incubaron con IFN- γ en PBS, NaCl 0,9% p/v o NaCl 0,5% p/v. Se observó una mayor adsorción en el medio de menor fuerza iónica en ambos tipos de nanopartículas (Figura R.2a). Además, la mayor pérdida de IFN- γ en el proceso se produjo en el caso de las nanopartículas de baja carga superficial, especialmente en el medio de mayor fuerza iónica (Figura R.2a), lo que confirmó la naturaleza electrostática de la interacción.

1.3 Efecto del pH en el proceso de liberación del IFN- γ .

Para analizar cómo afecta el pH del medio a la interacción se utilizaron las muestras DMSA y DEX a las que se adsorbió IFN- γ . Tras el proceso de interacción y el lavado, se incubaron las muestras en NaCl 0,5% a pH entre 5,5 y 9, con intervalos de 0,5 unidades. Tras la incubación



se analizó la cantidad de IFN- γ liberada en cada caso. La mayor cantidad de citoquina se liberó a pH 8 (Figura R.2b). Este resultado apoya la idea de que la interacción entre el IFN- γ y las nanopartículas se debe principalmente a la atracción entre cargas de signo contrario, ya que el pH de liberación está cercano al punto isoeléctrico teórico del IFN- γ murino utilizado ($pI = 8,1-9,1$, calculado con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy). Se observó otro pico de liberación a pH 5,5, que no se utilizó en los siguientes experimentos por estar muy alejado de las condiciones fisiológicas.

Figura R.2

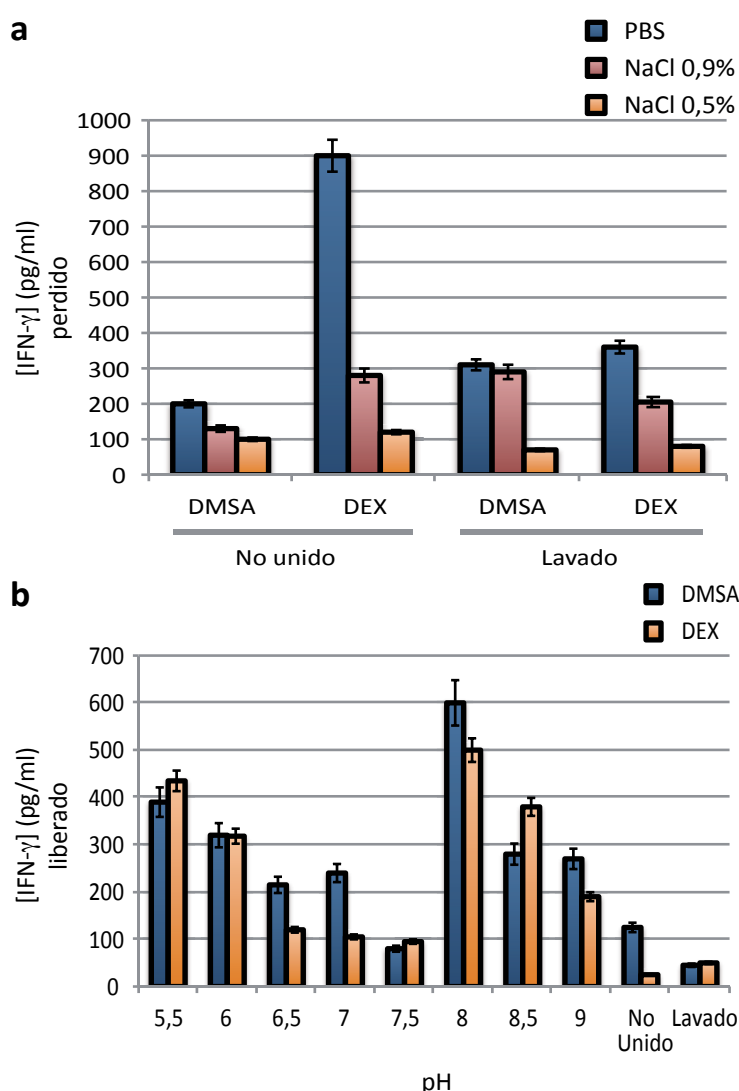


Figura R.2. Efectos de la fuerza iónica y el pH del medio en la interacción entre las nanopartículas y el IFN- γ . **a)** Detección mediante ELISA de la cantidad de IFN- γ perdido en el proceso de interacción con dos tipos de nanopartículas, uno de carga superficial negativa débil (DEX, dextrano) y otro de mayor carga superficial negativa (DMSA, ácido dimercaptosuccínico) en medios de distinta fuerza iónica. **b)** Ensayo de liberación del IFN- γ (1 ng/ml) previamente unido a nanopartículas cubiertas de DEX o DMSA en soluciones de NaCl 0,5% p/v a distinto pH. La cantidad de IFN- γ liberado se determinó mediante ELISA. Los datos representan las medias \pm D.E. en pg/ml de IFN- γ , de los resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado.

1.4 Efecto del tiempo de incubación en la adsorción.

El IFN- γ es una proteína termoinestable. La vida media aproximada de la versión recombinante del IFN- γ murino que se ha utilizado en este trabajo es de 30 horas (calculada con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy). Dado el corto periodo de tiempo en que el IFN- γ es funcional,



RESULTADOS

es importante que el proceso de adsorción y posterior liberación de la citoquina se realice en el menor tiempo posible. Para determinar el tiempo óptimo de incubación que producía la máxima adsorción de IFN- γ sin que se produjera su degradación, se realizó un análisis de cinética de interacción. Se utilizaron las muestras DMSA y DEX y se resuspendieron en una solución de NaCl 0,5% a pH 7 que contenía 2 ng/ml de IFN- γ . Se incubaron durante distintos tiempos (30, 60, 90, 120, 150 ó 180 minutos). Tras la eliminación de las nanopartículas mediante separación magnética y el lavado, se recogieron los sobrenadantes para su análisis. La menor cantidad de IFN- γ perdido como IFN- γ no unido o lavado se obtuvo tras 120 minutos de incubación, sin que se observara una disminución a partir de ese momento (**Figura R.3a**). Por tanto, la máxima adsorción de IFN- γ a las nanopartículas se obtuvo a las 2 horas, por lo que éste se consideró el tiempo óptimo de incubación.

Figura R.3

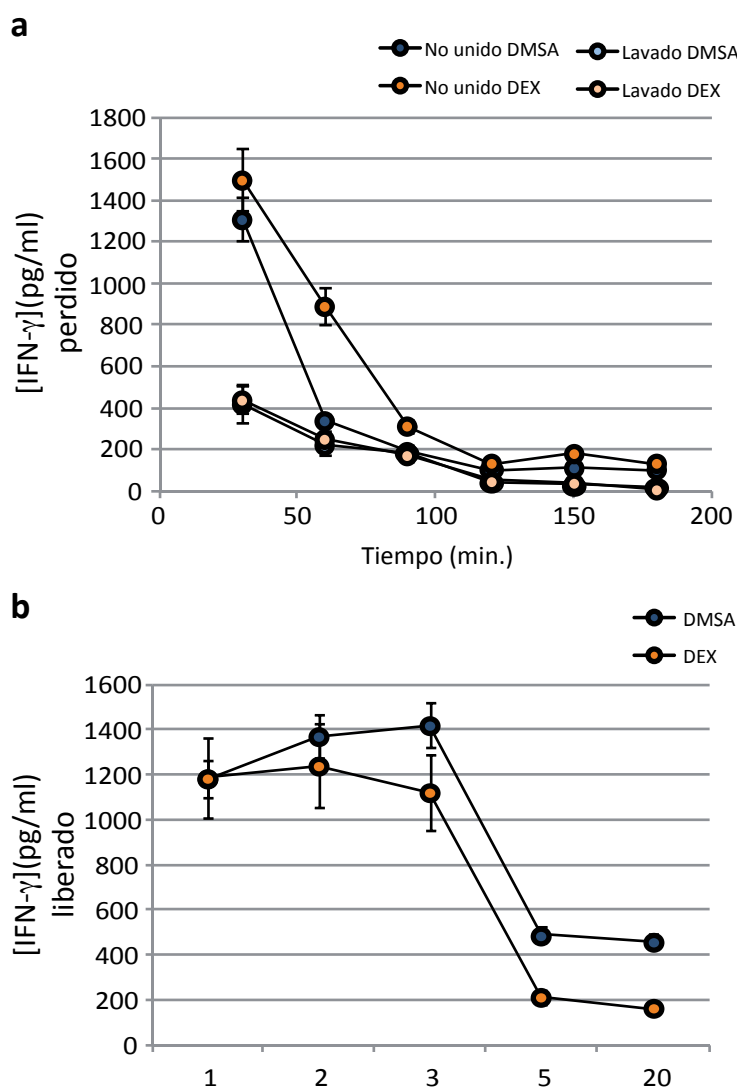


Figura R.3. Efecto del tiempo de incubación en la adsorción y liberación de IFN- γ . a)

Análisis del tiempo óptimo de incubación para la interacción entre el IFN- γ y las nanopartículas magnéticas (DMSA, ácido dimercaptosuccínico o DEX, dextrano). **b)** Ensayo de cinética de liberación del IFN- γ (2 ng/ml) previamente unido a nanopartículas DMSA o DEX, en una solución NaCl 0,5% p/v y pH 8. Las nanopartículas se incubaron durante distintos periodos de tiempo para determinar el óptimo. Todos los análisis se realizaron mediante ELISA. Los datos representan las medias \pm D.E. en pg/ml de IFN- γ , de los resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado.



1.5 Efecto del tiempo de incubación en la liberación.

De igual manera que se determinó el tiempo óptimo de incubación para la interacción, se consideró necesario analizar cuál sería el tiempo de incubación que produciría la máxima desorción de IFN- γ sin correr riesgo de que se degradase. Para ello se realizó un análisis de cinética de liberación. De nuevo se utilizaron las muestras DMSA y DEX a las que previamente se unió el IFN- γ , se resuspendieron en NaCl 0,5% a pH 8 y se incubaron durante distintos tiempos (1, 2, 3, 5 ó 20 horas). Tras la eliminación de las nanopartículas mediante separación magnética, se analizaron los sobrenadantes. La máxima liberación de IFN- γ se obtuvo tras 2 horas de incubación, sin que se observara un aumento a partir de ese momento (**Figura R.3b**). La cantidad de IFN- γ detectada a tiempos largos resultó ser menor, probablemente debido a la degradación parcial de la citoquina.

1.6 Adsorción/liberación de IFN- γ en función del tipo de nanopartículas.

Las propiedades del medio en el que se encuentran las nanopartículas van a determinar ciertas características de las mismas, como la carga superficial efectiva, el estado de agregación o dispersión, la estabilidad, etc. No obstante hay ciertas **características intrínsecas de las nanopartículas que van a determinar sus propiedades superficiales**, entre ellas la **composición química del material, la funcionalización de la superficie, la forma y el ángulo de curvatura, la porosidad o cristalinidad, su heterogeneidad y la hidrofobicidad o hidrofiliidad de la muestra** (Nel et al., 2009). Estas características **contribuyen activamente a las interacciones de las nanopartículas con distintos componentes del medio en el que se encuentran**, como iones, proteínas u otras moléculas orgánicas.

Siendo así, es esperable que distintos tipos de nanopartículas interaccionen de forma diferente con el IFN- γ , y por ello se estudió su adsorción a varios tipos de nanopartículas cargadas negativamente en superficie (DMSA, DEX, PPA, CIT y CDEX), y una muestra con carga positiva como control (NDEX). Se midió la pérdida de citoquina como IFN- γ no unido y el arrastrado en los lavados (**Figura R.4a**). Se observó que las nanopartículas cargadas negativamente unieron IFN- γ en mayor o menor medida, siendo las muestras DMSA y DEX las que presentaron una mayor eficiencia de carga (90% del IFN- γ añadido), frente a la pérdida de la mayor parte del IFN- γ en el caso de la muestra con carga superficial positiva.

Se utilizaron posteriormente todas las muestras de nanopartículas a las que habíamos adsorbido IFN- γ para determinar en qué caso se liberaba la mayor cantidad de citoquina. La liberación se produjo en todas las muestras de nanopartículas con carga negativa (**Figura R.4b**), llegando a ser de aproximadamente el 75% del IFN- γ inicial en las muestras DMSA y CDEX. Las nanopartículas NDEX, cargadas positivamente, no liberaron proteína, ya que no la habían



RESULTADOS

adsorbido con anterioridad. Dado que los niveles de citoquina liberada no se correlacionan con la cantidad de IFN- γ que se había unido previamente a cada tipo de nanopartícula, los resultados sugieren que el tipo de nanopartícula no sólo influye en la cantidad de molécula con la que interaccionan, sino también en las características de esta interacción, que puede tener distinta estabilidad, de forma que la liberación de IFN- γ se produce de forma diferente para cada tipo de nanopartícula.

Figura R.4

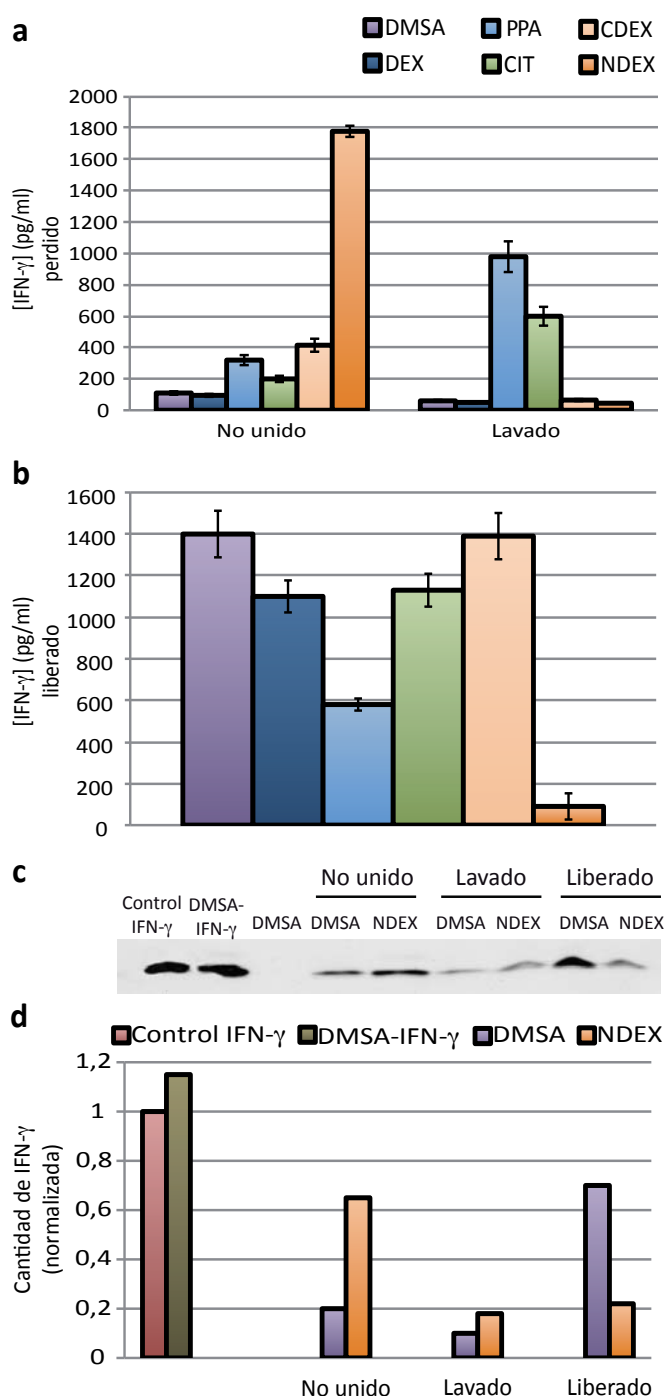


Figura R.4. Efecto de la cubierta de las nanopartículas en los procesos de adsorción y liberación de IFN- γ . **a)** Se añadieron diferentes tipos de nanopartículas (300 μ g/ml) en una solución de IFN- γ (2 ng/ml) en NaCl 0,5% p/v a pH 7, y se incubaron durante 2 horas. Posteriormente se lavaron en NaCl 0,5% p/v y 1% p/v BSA y se recogieron los sobrenadantes para su análisis mediante ELISA. **b)** Los diferentes tipos de nanopartículas a las que previamente se unió el IFN- γ , se resuspendieron en NaCl 0,5% p/v a pH 8, se incubaron durante 2 horas y se recogieron los sobrenadantes para analizar mediante ELISA la cantidad de IFN- γ liberado. **c)** La cantidad de IFN- γ no unido, arrastrado en los lavados y unido a las nanopartículas cubiertas de DMSA o NDEX se resolvió por SDS-PAGE y *Western blot*. **d)** Cuantificación de las bandas obtenidas mediante *Western blot*, normalizadas respecto al control. En **a** y **b** los datos representan las medias \pm D.E. en pg/ml de IFN- γ , de los resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado.



Se utilizó además otro método de detección de IFN- γ mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida e inmunodetección mediante *Western blot*, para analizar las diferencias entre las cantidades de IFN- γ no unido, lavado y liberado, utilizando las muestras DMSA y NDEX. Se observó que en este caso la presencia de nanopartículas no interfirió en la detección de IFN- γ (Figura R.4c, d). Los resultados fueron similares a los obtenidos mediante ELISA, de forma que la muestra DMSA adsorbió una gran parte del IFN- γ inicial, que posteriormente liberó, frente a la pérdida de la mayor parte de la citoquina, que no se unió o se eliminó en los lavados, en el caso de la muestra NDEX (Figura R.4c, d).

1.7 Efecto de la temperatura en la adsorción/liberación de IFN- γ .

Pensando en las futuras aplicaciones *in vivo* de este sistema de distribución de IFN- γ , se analizó la adsorción y liberación de citoquina en la muestra DMSA a 37°C, utilizando medio a pH 7 para la interacción y pH 8 para la liberación. No se encontraron diferencias significativas entre los resultados a temperatura ambiente o 37°C (Figura R.5).

Figura R.5

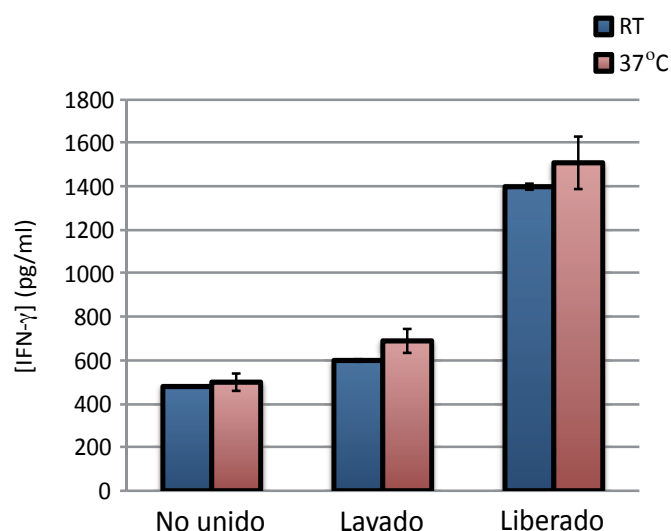


Figura R.5, Efecto de la temperatura en el proceso de interacción y liberación del IFN- γ . Se llevó a cabo el proceso de adsorción y liberación del IFN- γ a las nanopartículas cubiertas de DMSA a temperatura ambiente (RT) y 37°C. Las muestras recogidas se analizaron mediante ELISA. Los datos representan las medias \pm D.E. en pg/ml de IFN- γ , de los resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado.

1.8 Reducción en la pérdida de IFN- γ en medios de alta fuerza iónica en presencia de un exceso de nanopartículas.

Para poder utilizar las nanopartículas como vehículos de administración de IFN- γ tanto en cultivo celular como en modelos animales, consideramos necesario minimizar la pérdida de citoquina en medios de alta fuerza iónica. Con este fin, se incubó el IFN- γ con una cantidad mayor de nanopartículas (de 300 μ g/ml a 3 mg/ml) en PBS o PBS 3% FBS, siguiendo el mismo procedimiento que en los anteriores ensayos. La cantidad de IFN- γ presente en cada muestra se analizó mediante *Western blot*. Se observó que el exceso de nanopartículas conllevó una



RESULTADOS

importante disminución de la pérdida de IFN- γ en medios de alta fuerza iónica (Figura R.6), lo que permitió su posterior utilización en ensayos *in vitro*, e *in vivo*.

Figura R.6

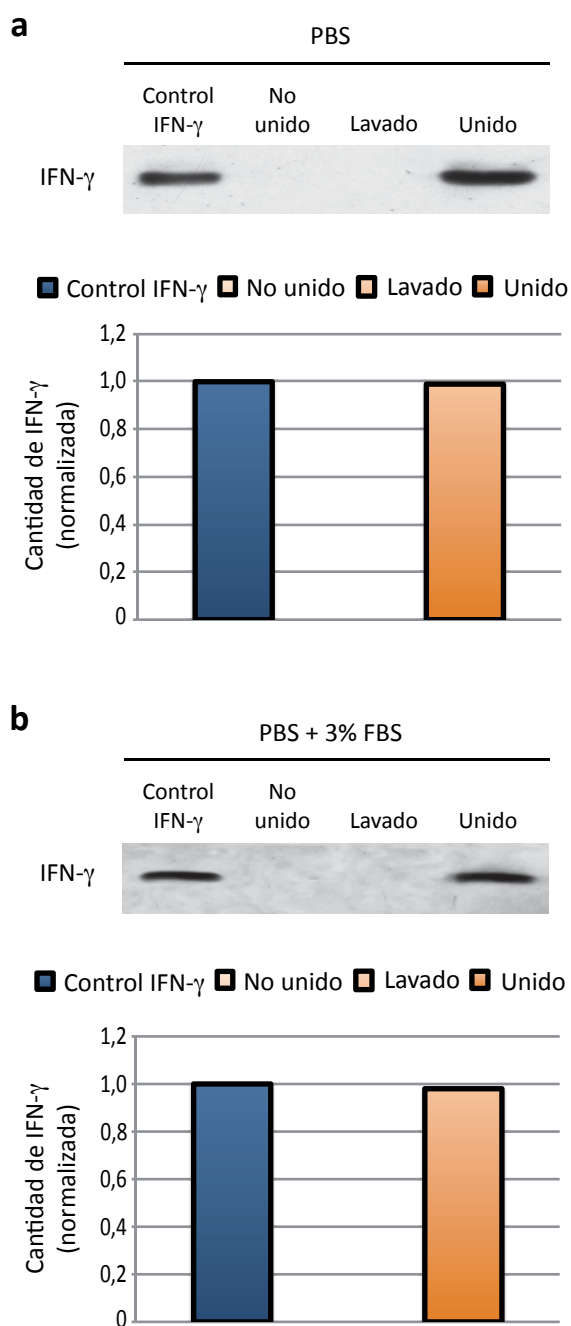


Figura R.6. Disminución de la pérdida de IFN- γ en medios de alta fuerza iónica e presencia de un exceso de nanopartículas. La cantidad de IFN- γ no unido, arrastrado en los lavados o unido a las nanopartículas cubiertas de DMSA (3 mg/ml) en dos medios de alta fuerza iónica como a) PBS o b) PBS 3% FBS) se resolvió por SDS-PAGE y *Western blot*, se realizó la cuantificación de las bandas obtenidas en cada caso, y se normalizó respecto al control.

1.9 Funcionalidad del IFN- γ tras la interacción con las nanopartículas.

Con el fin de determinar la funcionalidad del IFN- γ tras el proceso de interacción con las nanopartículas magnéticas, se analizó su capacidad de activar **macrófagos** primarios. **El IFN- γ induce en este tipo de células la producción y secreción de distintas citoquinas, y**



de ciertas proteínas de membrana, como CD40 (Schroder et al., 2004). Para ello se utilizó IFN- γ comercial libre, IFN- γ unido a las nanopartículas DMSA (IFN- γ -DMSA-NP) e IFN- γ liberado para activar *in vitro* macrófagos murinos primarios, y se analizó la expresión de CD40 mediante citometría de flujo. Tanto el porcentaje de macrófagos activados como los niveles de fluorescencia observados tras el tratamiento con IFN- γ -DMSA-NP o con IFN- γ liberado, fueron similares o incluso mayores que los obtenidos con el IFN- γ comercial (Figura R.7). Estos resultados indican que la funcionalidad del IFN- γ no se vio alterada tras el proceso.

Figura R.7

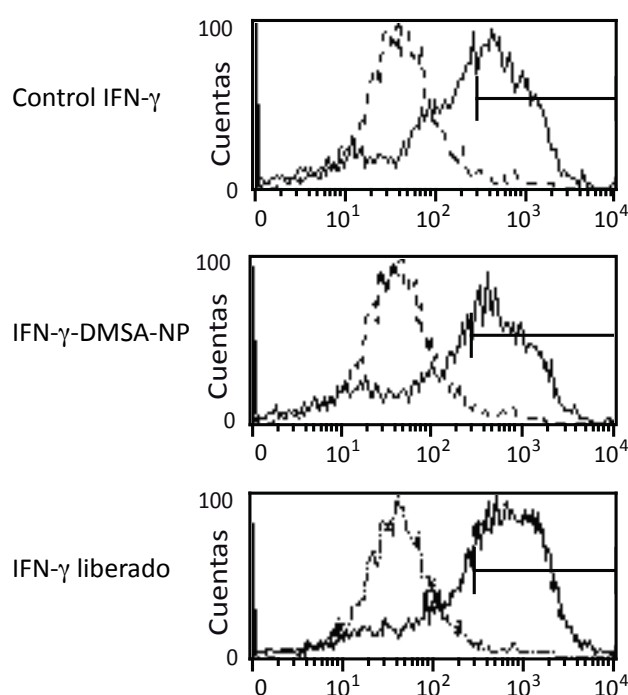


Figura R.7. Ensayo funcional del IFN- γ tras el proceso de adsorción y liberación de las nanopartículas cubiertas de DMSA. Se obtuvieron macrófagos murinos mediante inyección intraperitoneal de caseína en ratones C57BL/6. Tras 24 horas se recogieron los macrófagos mediante lavado peritoneal con PBS frío, se cultivaron en condiciones estándar de cultivo y tras 24 horas se añadieron diferentes tratamientos: IFN- γ soluble como control positivo, IFN- γ unido a nanopartículas magnéticas cubiertas de DMSA (IFN- γ -DMSA-NP) o IFN- γ liberado de las nanopartículas. Se utilizaron además macrófagos sin tratar como control negativo (línea discontinua). Tras 24 horas de incubación en presencia de los diferentes tratamientos las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD40-PE y se analizaron mediante citometría de flujo.

1.10 Cambios en las características de las nanopartículas tras la unión del IFN- γ .

Los aspectos que determinan la biodistribución y toxicidad de las nanopartículas en un organismo, la captación de las nanopartículas por parte de los distintos tipos celulares, su interanálisis y su localización subcelular son, entre otros, el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas (Alexis et al., 2008; Hillaireau y Couvreur, 2009; Villanueva et al., 2009; de Freitas et al., 2008). Teniendo en cuenta que pretendemos utilizar las nanopartículas magnéticas cubiertas de DMSA como sistema de distribución de IFN- γ , y que la interacción entre la citoquina y las nanopartículas es de naturaleza electrostática, se analizó la variación del radio hidrodinámico y la carga superficial de éstas tras la adsorción de IFN- γ . El radio hidrodinámico, que representa el tamaño de la nanopartícula y el volumen de agua que forma la capa de solvatación alrededor de su superficie, pasó de ser inferior a 100 nm, a llegar a los 400 nm tras la adsorción de IFN- γ . (Figura R.8a). La interacción entre las nanopartículas



y el IFN- γ , basada en la atracción de cargas de signo contrario, produjo la neutralización parcial de las cargas negativas de la superficie de las nanopartículas, de forma que la carga neta media pasó de -40 mV a -23 mV (Figura R.8b). Este cambio en las características físicas de las nanopartículas podría modificar su interacción, internalización celular y biodistribución, por lo que estos ensayos se realizaron con nanopartículas solas (DMSA-NP) o unidas a IFN- γ (IFN- γ -DMSA-NP).

Figura R.8

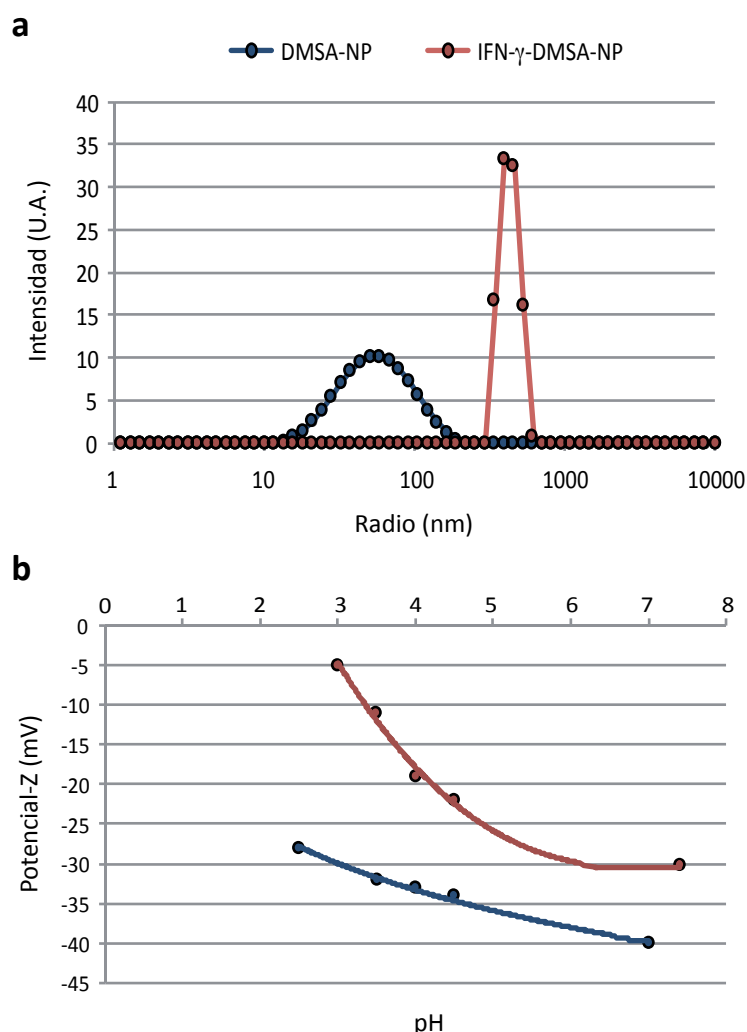


Figura R.8. Caracterización coloidal de las nanopartículas cubiertas de DMSA solas o unida a IFN- γ . La caracterización coloidal se llevó a cabo mediante dispersión dinámica de luz (DLS). **a)** Para determinar el radio hidrodinámico se prepararon suspensiones estables de DMSA-NP o IFN- γ -DMSA-NP a una concentración aproximada de 0,5 mM de Fe, y se midieron en modo intensidad. **b)** Para analizar el potencial Z de las muestras se añadió KNO_3 hasta una concentración de 0,01 M para asegurar una fuerza iónica constante al cambiar el pH del medio. El cambio de pH se realizó añadiendo cantidades crecientes de KOH o HNO_3 . Se midió la velocidad de migración de las partículas al aplicar una diferencia de potencial a la muestra (movilidad electroforética), lo que permite conocer la carga superficial de las nanopartículas.



2. Análisis de la internalización y citotoxicidad de las nanopartículas DMSA en células Pan02 *in vitro*.

El desarrollo de nuevas tecnologías con fines biomédicos conlleva la necesidad de determinar los posibles riesgos y efectos secundarios que se deriven de su uso, lo que es de especial importancia en el caso de la nanotecnología (Medina et al., 2007; Kroll et al., 2009). La toxicidad de las partículas magnéticas depende de su composición química y de parámetros morfológicos como el tamaño, la forma, la cubierta con la que se funcionalizan, el área superficial, la estructura, porosidad, hidrofobicidad o hidrofiliidad, carga superficial, estado de agregación, oxidación y degradación (Villanueva et al., 2009; Nel et al., 2009; Krishnan, 2010). En el caso concreto de las nanopartículas el riesgo de toxicidad aumenta, ya que su **relación superficie/masa es mayor**, y por tanto son más reactivas. Además permanecen más tiempo en el organismo, debido a que su **tiempo de aclaramiento es más largo** y, en principio, **pueden llegar a zonas más profundas en los tejidos** (Krishnan, 2010). Para determinar la toxicidad de las nanopartículas se requiere la realización de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* (Dhawan y Sharma, 2010). **La medida de la citotoxicidad *in vitro* se puede realizar de diversas maneras.** La más sencilla es la **inspección visual de las células mediante microscopía de campo claro**. De esta manera se pueden observar cambios en la morfología de la célula o del núcleo (Fiorito et al., 2006; Lewinski et al., 2008). En la mayoría de los casos se utilizan otros **ensayos para determinar la viabilidad celular basados en métodos colorimétricos**, sin embargo **las propiedades ópticas de las nanopartículas presentes en el medio pueden interferir en la detección**, generando resultados erróneos (Lewinski et al., 2008; Kroll et al., 2009; Soenen et al., 2009; Krishnan, 2010). Por este motivo en el presente trabajo se han llevado a cabo varios de estos procedimientos para evitar, en lo posible, errores a la hora de determinar la viabilidad celular en presencia de nanopartículas.

2.1 Captación e internalización de las DMSA-NP en células Pan02.

Para evaluar la captación de las nanopartículas, se incubaron las células Pan02 solas, con DMSA-NP o con IFN- γ -DMSA-NP, y se analizó la presencia de nanopartículas en el cultivo mediante microscopía de campo claro. Tras 24 horas de incubación, las células habían internalizado parte de las nanopartículas, que presentaban un patrón de distribución perinuclear (Figura R.9a).

La internalización fue menor en el caso de la muestra IFN- γ -DMSA-NP comparado con las DMSA-NP (Figura R.9a), probablemente debido a la neutralización parcial de las cargas superficiales de las nanopartículas al adsorber el IFN- γ . Estas observaciones se confirmaron realizando una tinción de azul de Prusia, específica para detectar hierro (Figura R.9b). Se



RESULTADOS

midio además la cantidad de nanopartículas internalizadas en las células mediante un método colorimétrico basado en la ferrocina (Riemer et al., 2004), que es un quelante de iones de hierro con los que forma complejos que absorben luz a una longitud de onda de 550 nm, lo que permite cuantificar la cantidad de hierro presente en una muestra. Las muestras procedentes de cultivos de células en las que se hayan internalizado las nanopartículas presentarán una mayor concentración de hierro. Los resultados fueron similares a los extraídos de observaciones mediante microscopía (Figura R.9c). La internalización de nanopartículas fue significativamente menor en las células incubadas con IFN- γ -DMSA-NP ($89,3 \pm 11,3 \mu\text{g}$ de Fe; $p = 0,017$) comparadas con las células incubadas con DMSA-NP ($247,1 \pm 60,3 \mu\text{g}$ de Fe).

Figura R.9

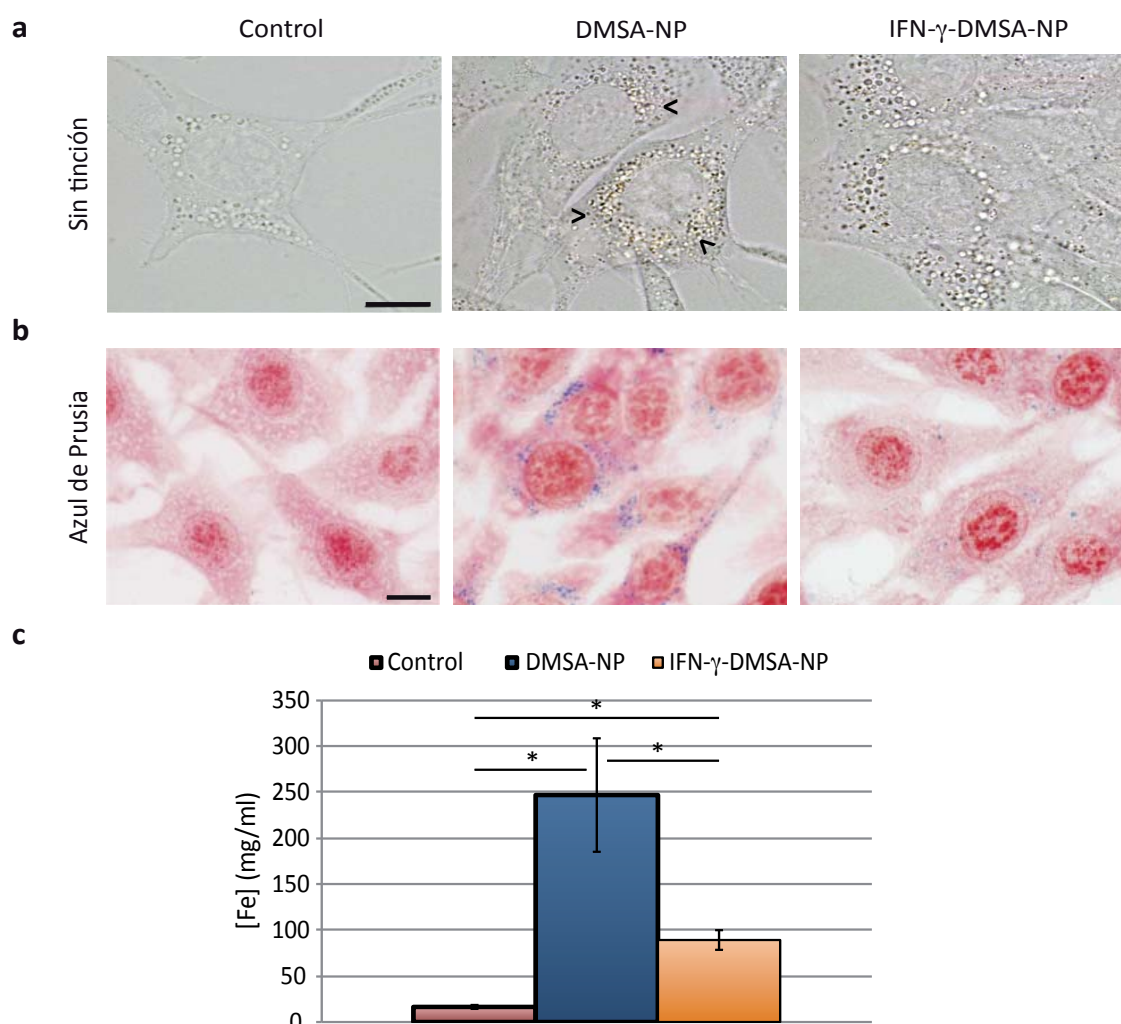


Figura R.9. Internalización de las nanopartículas en las células Pan02. **a)** Células Pan02 en cultivo tras 24 horas de incubación solas (control), en presencia de nanopartículas libres (DMSA-NP; 0,5 mg/ml) o unidas a IFN- γ (IFN- γ -DMSA-NP; 15000 UI/ml IFN- γ + 0,5 mg/ml Nanopartículas). Las células no fueron fijadas ni teñidas para evitar posibles artefactos a la hora de observarlas. Las nanopartículas se pueden ver en el citoplasma de las células como puntos de color amarillo (flechas). Barra de escala: 10 μm . **b)** Tinción de azul de Prusia para la detección de hierro en las células. Las zonas azules corresponden a las

Continúa en pág. 95



2.2 Destino de las nanopartículas en las células Pan02.

Las células pueden captar nanopartículas mediante interacciones específicas (receptor-ligando) y no específicas (hidrofóbicas, coulombianas) (Gao et al., 2005; Decuzzi y Ferrari, 2007). Las nanopartículas cargadas en su superficie pueden interactuar con grupos de la superficie de la membrana plasmática y ser endocitadas (Nel et al., 2009), por tanto su destino sería el compartimento lisosomal de la célula. Para comprobar si esto es así en el caso de las DMSA-NP, se incubaron células Pan02 con las nanopartículas y se utilizó el marcador LysoTracker Red DND-99, específico para lisosomas. La distribución perinuclear observada para estas nanopartículas solapaba en gran parte con el marcador utilizado, lo que confirma que las nanopartículas internalizadas son degradadas en el compartimento lisosomal (Figura R.10).

Figura R.10

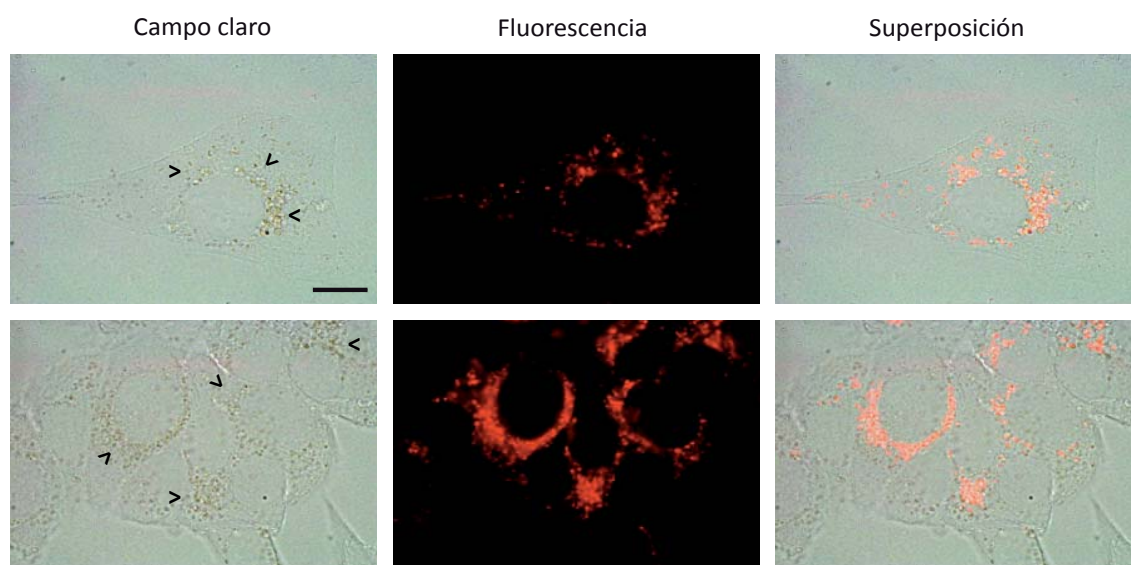


Figura R.10. Localización de las nanopartículas en las células Pan02. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSA-NP (0,5 mg Fe/ml) y posteriormente se marcaron con el marcador fluorescente LysoTracker Red durante 30 minutos, que permite conocer la localización de lisosomas y endosomas tardíos. Tras el marcaje las células se observaron mediante microscopía de campo claro para visualizar las células y las nanopartículas, y de fluorescencia para visualizar el marcaje con LysoTracker. Las nanopartículas se pueden ver en las células como puntos de color amarillo (flechas) al observarlas mediante microscopía de campo claro. Barra de escala: 10 μ m.



nanopartículas presentes en las células. Barra de escala: 10 μ m. **c)** Cuantificación de la cantidad de hierro presente en las células mediante un método colorimétrico basado en la ferrocina, que es un quelante de iones de hierro con los que forma complejos que absorben luz de una longitud de onda de 550 nm. Los datos representan las medias \pm D.E. en mg/ml de Fe, calculados a partir de la absorbancia de las muestras a 550 nm e interpolación de los datos en una recta patrón construida a partir de muestras de concentración de Fe conocida (*, $p < 0,05$).



2.3 Citotoxicidad de las nanopartículas en las células Pan02.

Dentro de los efectos que dependen de la captación e internalización de nanopartículas en las células se encuentra la **toxicidad directa**, a corto plazo, en la que se incluyen la **afectación del metabolismo celular** (O'Brien et al., 2000), **alteraciones en la integridad la de membrana plasmática o lisosomal** (Altman et al., 1993; Borenfreund y Puerner, 1985), o **alteración en el metabolismo mitocondrial** (Mosmann, 1983).

El ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 dimetiltetrazolio), que determina la actividad mitocondrial de las células, es el ensayo más utilizado para determinar la viabilidad celular. La succinato deshidrogenasa rompe el anillo de tetrazolio generando formazán, de color púrpura, sólo en aquellas células que mantienen su actividad mitocondrial intacta (Mosmann, 1983). Para analizar si existían diferencias en la viabilidad celular en presencia de DMSA-NP se realizó un primer análisis con distintas dosis de nanopartículas en el medio de cultivo (0,05; 0,1 ó 0,5 mg/ml) y diferente tiempo de incubación (24 ó 48 horas). Tras la incubación se realizó un ensayo MTT. Los resultados indicaron que tras 24 horas de incubación, incluso a altas concentraciones de nanopartículas (0,5 mg/ml), las células presentaron porcentajes de viabilidad similares a los controles (Figura R.11a). Al mantener la incubación durante 48 horas el porcentaje de células viables sólo disminuyó hasta un 93% para la mayor concentración de nanopartículas (Figura R.11a).

Una vez comprobado el efecto de las DMSA-NP en la viabilidad de las células Pan02, y teniendo en cuenta el uso que se pretende dar a las nanopartículas, se analizó la viabilidad celular no solo en presencia de DMSA-NP, sino en células tratadas con IFN- γ soluble o IFN- γ -DMSA-NP. Se utilizó, además del MTT, otro método para comprobar los efectos citotóxicos de estos tratamientos. La resazurina, o AlamarBlue, es un compuesto no fluorescente, de color azul, que en las células vivas se reduce por su actividad metabólica formando resorufina, de color rojo y altamente fluorescente, fundamentalmente porque la resazurina actúa como aceptor de electrones para coenzimas como NADH, NADPH y FADH (O'Brien et al., 2000). Los resultados obtenidos por ambos métodos fueron similares (Figura R.11b). Las nanopartículas por sí solas no produjeron una disminución en el porcentaje de viabilidad celular, mientras que el IFN- γ soluble o el IFN- γ -DMSA-NP presentaron una disminución altamente significativa en la viabilidad celular, respecto al control (Figura R.11b).

2.4 Efectos de las DMSA-NP en el citoesqueleto de las células Pan02.

Además de los efectos citotóxicos directos, las nanopartículas pueden generar otros efectos secundarios a largo plazo en las células, que representan lo que se conoce como **toxicidad indirecta** (Soenen et al., 2009). Uno de estos efectos secundarios es el **cambio en la arquitectura**



del citoesqueleto, lo que puede producir cambios en la morfología celular, una reducción en la capacidad proliferativa, defectos en la migración o en la diferenciación de las células (Pernodet et al., 2006; Lipski et al., 2008).

Figura R.11

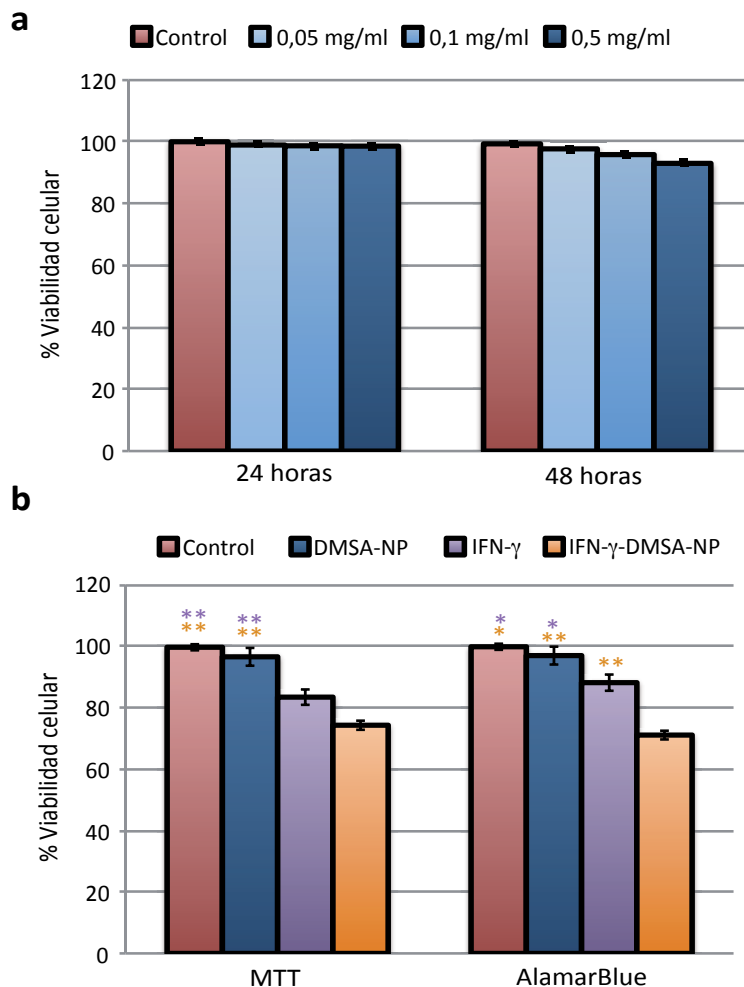


Figura R.11. Análisis de la citotoxicidad de las nanopartículas cubiertas de DMSA en células Pan02 mediante ensayos de MTT y AlamarBlue. **a)** Determinación de la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT tras la exposición del cultivo a diferentes concentraciones de DMSA-NP durante 24 ó 48 horas. **b)** La viabilidad celular se determinó mediante ensayos de MTT y AlamarBlue en células Pan02 cultivadas solas o en presencia de DMSA-NP (0,5 mg Fe/ml), IFN- γ (10000 UI/ml) o IFN- γ -DMSA-NP (0,5 mg Fe/ml + 10000 UI/ml IFN- γ) durante 24 horas. Los datos representan las medias \pm D.E. del porcentaje de células viables, tomando como control (100%) las células sin tratar. Datos de dos experimentos realizados por triplicado (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).

Para visualizar el citoesqueleto de actina se utilizó faloidina marcada con TRITC. La faloidina se une específicamente a la F-actina, lo que permite distinguir los filamentos mediante microscopía de fluorescencia. Al comparar el citoesqueleto de actina de las células Pan02 control con las tratadas con DMSA-NP no se observaron diferencias (Figura R.12a). En ambos casos se observaron un gran número de filamentos de actina en la región perinuclear, mientras que la red de filamentos pierde densidad al llegar a la periferia. Se observan además unos prominentes contactos focales tanto en las células control como en las incubadas con DMSA-NP.

El citoesqueleto de tubulina se observó gracias al marcaje con un anticuerpo específico que reconoce la molécula de α -tubulina, y que está conjugado a FITC, de forma que se puede detectar



mediante microscopía de fluorescencia. En este caso tampoco se encontraron diferencias entre los controles y las células cultivadas en presencia de DMSA-NP (**Figura R.12b**). Se observó además que las fibras de tubulina eran normales en el proceso de división celular en células cultivadas en presencia de DMSA-NP (**Figura R.12c**).

Figura R.12

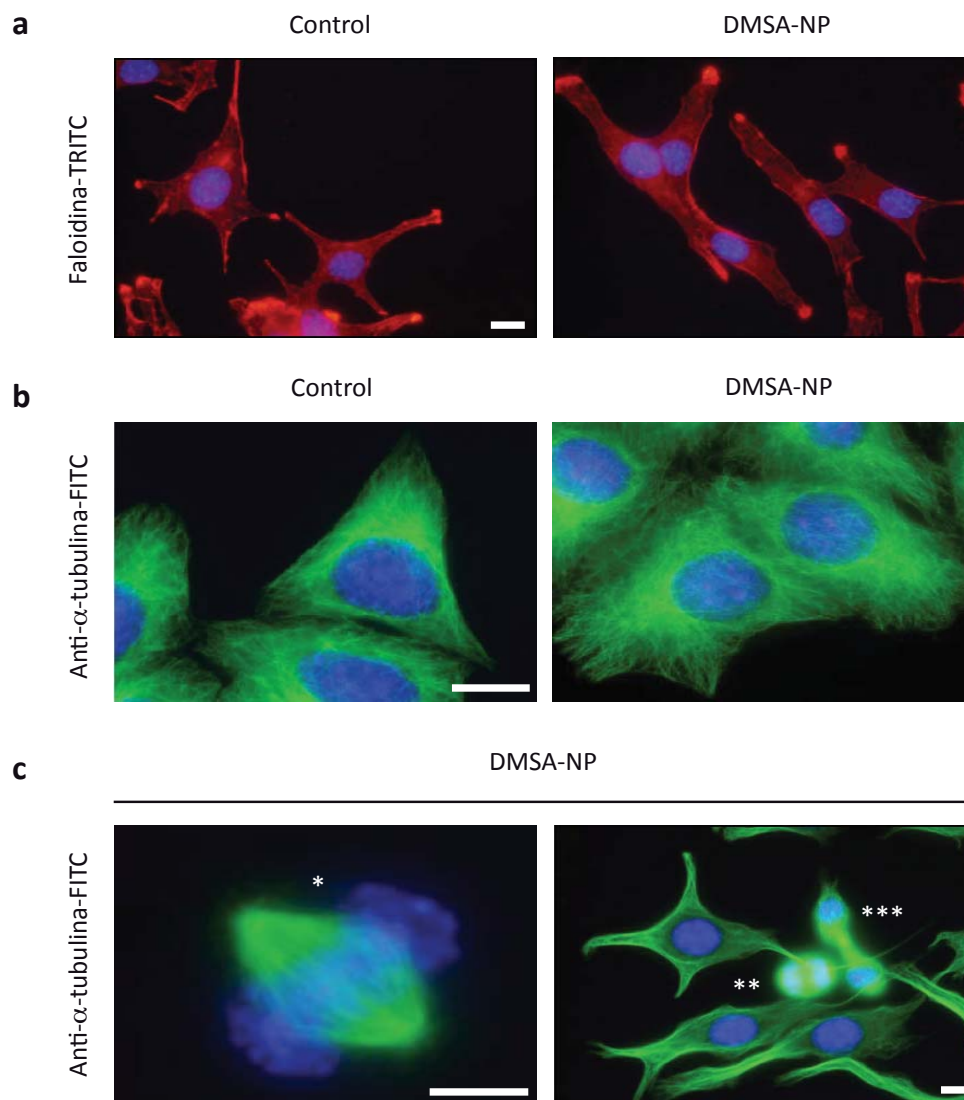


Figura R.12. Análisis del efecto de las nanopartículas cubiertas de DMSA sobre el citoesqueleto de las células Pan02.

a) Observación mediante microscopía de fluorescencia del citoesqueleto de actina. Las células se incubaron solas o con DMSA-NP (0,5 mg Fe/ml) durante 24 horas. Posteriormente se lavaron, se permeabilizaron con Triton x-100, se incubaron con faloidina-TRITC y se contratiñeron con Hoechst 33258. Barra de escala: 20 μm . **b)** Para observar el citoesqueleto de tubulina, tras la incubación con o sin DMSA-NP, las células se permeabilizaron y se marcaron con un anticuerpo anti- α -tubulina-FITC. La contratinción se realizó como en el apartado anterior. Barra de escala: 20 μm . **c)** El citoesqueleto de tubulina, marcado como en el apartado anterior, se pudo observar en algunas células en división que habían sido tratadas con DMSA-NP (0,5 mg Fe/ml, 24 horas) sin que se apreciaran alteraciones. En la figura se pueden observar una metafase (*), una anafase (**) y una telofase tardía (***). Barras de escala: 10 μm .



3. Análisis de la biodistribución y toxicidad de las nanopartículas DMSA *in vivo*.

Es esencial determinar la toxicidad y distribución *in vivo* de las nanopartículas magnéticas diseñadas para su futura aplicación como sistema de distribución de drogas en organismos vivos. **La biodistribución de las nanopartículas depende de propiedades como las características de su superficie, el tamaño, la forma y la concentración de las nanopartículas** (Chouly et al., 1996; Owens y Peppas, 2006; Kunath et al., 2002; Panagi et al., 2001), ya que estos factores pueden afectar a las interacciones de las nanopartículas con otros componentes del medio en el que se encuentran.

En colaboración con el Dr. Ruiz Cabello (Instituto de Estudios Biofuncionales, UCM, Madrid), y previamente al presente estudio, se analizaron la **distribución y aclaramiento de las DMSA-NP en ratas Wistar** para determinar la utilidad de estas nanopartículas como agentes de contraste. Los resultados obtenidos indicaron que **las DMSA-NP se eliminan del torrente sanguíneo fundamentalmente por el hígado y el bazo**, como se pudo observar mediante resonancia magnética (datos no mostrados). El tiempo de aclaramiento en sangre de las DMSA-NP se calculó realizando las curvas de imanación de muestras de sangre extraídas cada 10 minutos, de ratas a las que previamente se había administrado una dosis de DMSA-NP por vía intravenosa. **La vida media en sangre resultó ser de 3 minutos para partículas de tamaño hidrodinámico entre 65-70 nm, y de 15 min para partículas con tamaño hidrodinámico alrededor de 30 nm. El tiempo de permanencia en sangre depende también de la carga de las nanopartículas**, así las partículas neutras pueden permanecer horas en el torrente sanguíneo aunque tengan un gran tamaño, mientras que las partículas con carga son eliminadas a tiempos más cortos a pesar de tener tamaños menores.

Para comprobar si el uso de estas nanopartículas no produce problemas de toxicidad en nuestro modelo animal, y comprobar si la biodistribución es similar a la observada en ratas, se realizaron distintos ensayos en ratones C57BL/6 a los que se administraron varias dosis de DMSA-NP por distintas vías.

3.1 Estado general tras la administración repetida de DMSA-NP en ratones C57BL/6.

Para analizar los efectos de la administración de DMSA-NP en el estado general de los ratones, se establecieron tres grupos de tratamiento (n=10/grupo), que recibieron inyecciones i.v. de PBS (control), o inyecciones de DMSA-NP (300 µg Fe) por vía i.v. o s.c., tres veces por semana durante tres semanas. Para comprobar su estado se tuvieron en cuenta aspectos como la pérdida de peso, y la aparición de signos de toxicidad sistémica como bradicinesia o letargia, piloerección, síntomas gastrointestinales o respiración irregular. No se observó una disminución en el peso de los ratones en ningún grupo (Figura R.13), y sólo en dos casos se observó piloerección



RESULTADOS

en animales de grupos distintos (control y DMSA-NP i.v.) y en diferente fecha (Tabla R.1). Tras sacrificar a los animales se comprobó que el tamaño, aspecto y coloración de los órganos internos era aparentemente normal en todos los casos.

Figura R.13

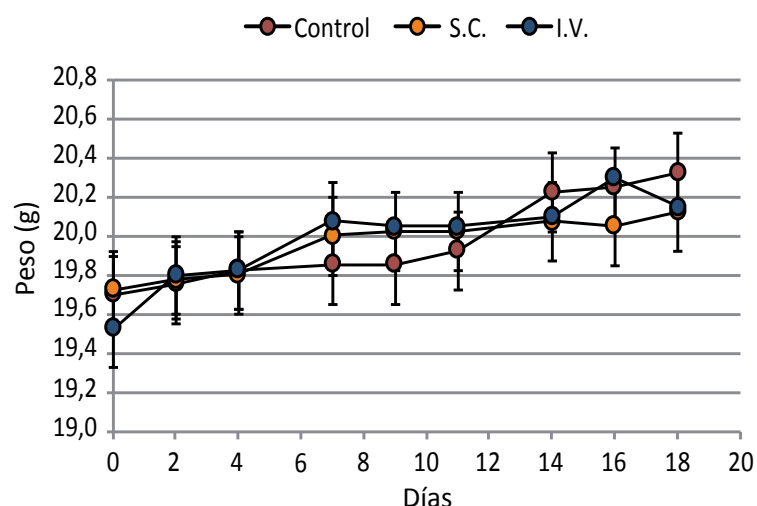


Figura R.13. Variación de peso de los ratones durante el periodo de administración de las DMSA-NP. Las nanopartículas se administraron por vía intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.) tres veces a la semana durante tres semanas. Los datos representan las medias \pm D.E.

A partir de los resultados obtenidos se consideró que la aplicación de nanopartículas a estas dosis no resultó tóxica para los ratones durante el periodo de observación.

Tabla R.1

Días	Letargia			Piloerección			Síntomas gastrointestinales			Síntomas respiratorios		
	PBS	NP I.V.	NP S.C.	PBS	NP I.V.	NP S.C.	PBS	NP I.V.	NP S.C.	PBS	NP I.V.	NP S.C.
0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
7	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
11	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
14	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
16	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
18	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Tabla R.1. Signos de toxicidad sistémica analizados en los ratones durante el periodo de administración de DMSA-NP.



3.2 Presencia de nanopartículas en distintos tejidos tras la administración repetida de DMSA-NP.

La detección de nanopartículas en distintos tejidos extraídos de los ratones tratados en el anterior apartado se realizó mediante medidas de magnetización. Se analizaron aquellos órganos más susceptibles de contener nanopartículas, como son el hígado, el bazo y los riñones, ya que estos órganos son los que median la eliminación de nanopartículas de hierro del sistema. Tras la liofilización de las muestras procedentes de ratones de los grupos control, s.c. e i.v., se obtuvieron las curvas de imanación de los tejidos (Figura R.14). **El comportamiento magnético de un órgano es la suma de los comportamientos magnéticos debidos a la presencia de nanopartículas (superparamagnético), el hierro endógeno presente (paramagnético) y el tejido en sí (diamagnético).** Dependiendo de la cantidad de cada uno de estas partes en la muestra, el comportamiento magnético puede estar dominado por uno u otro de los componentes. En el caso de los riñones analizados, la cantidad de nanopartículas presentes es muy pequeña, y es el comportamiento diamagnético del tejido el que domina cuando es sometido a un campo magnético de alta intensidad. En el caso de los bazos analizados, que contienen una gran cantidad de hierro de forma natural, presentan un comportamiento predominantemente paramagnético, incluso en los controles, a todas las intensidades de campo magnético utilizadas. Al analizar las muestras de hígado se observó que los controles presentan un comportamiento diamagnético a intensidades de campo moderadas y altas, ya que la cantidad de hierro endógeno en estos órganos es baja. Tras la inyección de nanopartículas por vía subcutánea no se aprecian cambios importantes en el comportamiento magnético de los tejidos, mientras que la administración intravenosa produce la acumulación de nanopartículas fundamentalmente en el hígado, en menor medida en el bazo y en cantidades aún menores en el riñón.

Los datos obtenidos de las medidas de magnetización permiten realizar la estimación del material magnético presente en cada órgano por comparación de las curvas de imanación de cada uno de ellos con las obtenidas con muestras de nanopartículas solas (Figura R.15a). Tras la administración subcutánea no se observó acumulación de nanopartículas en ninguno de los órganos (Figura R.15b), mientras que cuando las DMSA-NP se administraron por vía intravenosa la mayor acumulación se produjo en el hígado, seguido por el bazo y finalmente el riñón (Figura R.15b), como se podía deducir de las curvas de imanación.



Figura R.14

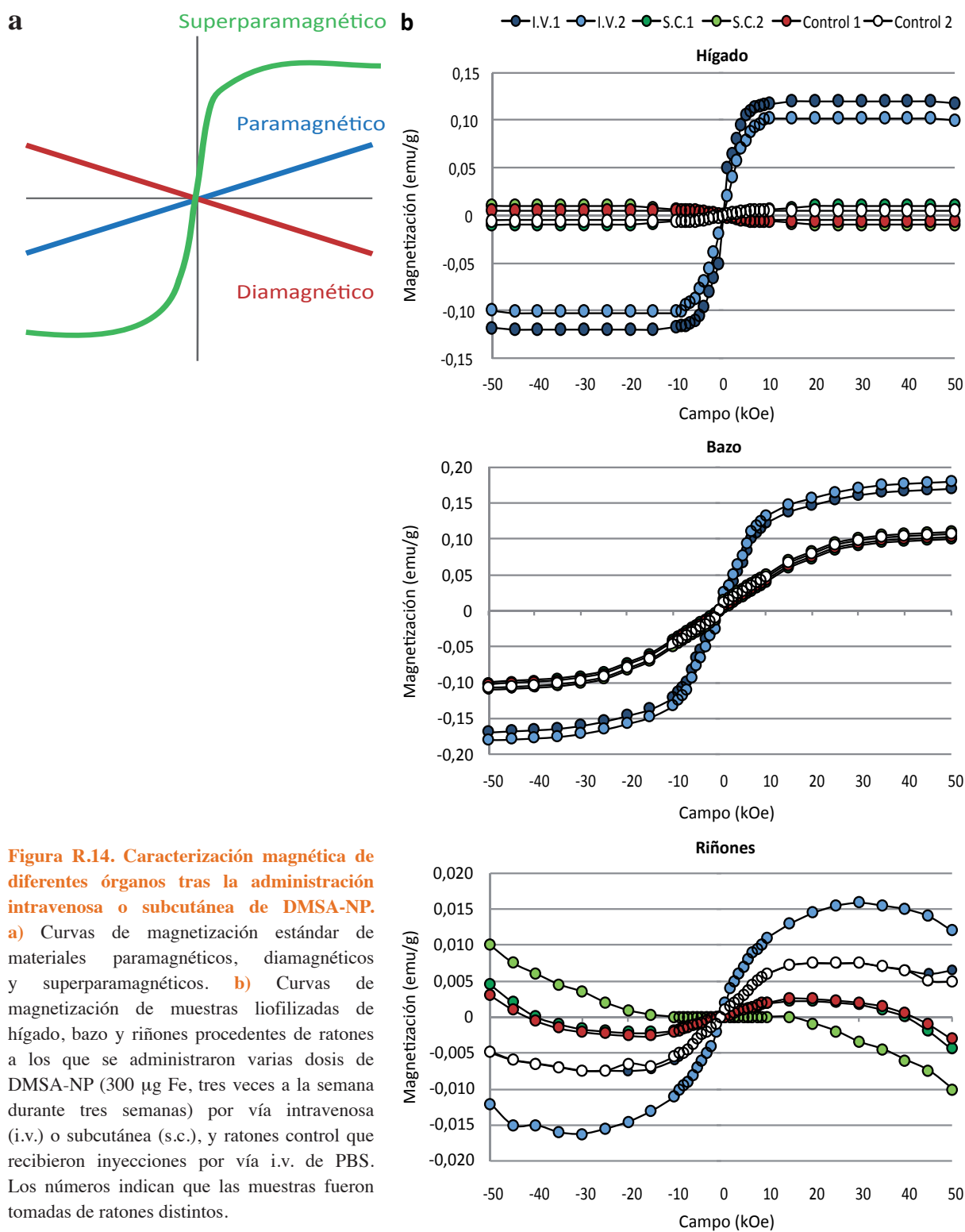


Figura R.14. Caracterización magnética de diferentes órganos tras la administración intravenosa o subcutánea de DMSA-NP. **a)** Curvas de magnetización estándar de materiales paramagnéticos, diamagnéticos y superparamagnéticos. **b)** Curvas de magnetización de muestras liofilizadas de hígado, bazo y riñones procedentes de ratones a los que se administraron varias dosis de DMSA-NP (300 μ g Fe, tres veces a la semana durante tres semanas) por vía intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.), y ratones control que recibieron inyecciones por vía i.v. de PBS. Los números indican que las muestras fueron tomadas de ratones distintos.



Figura R.15

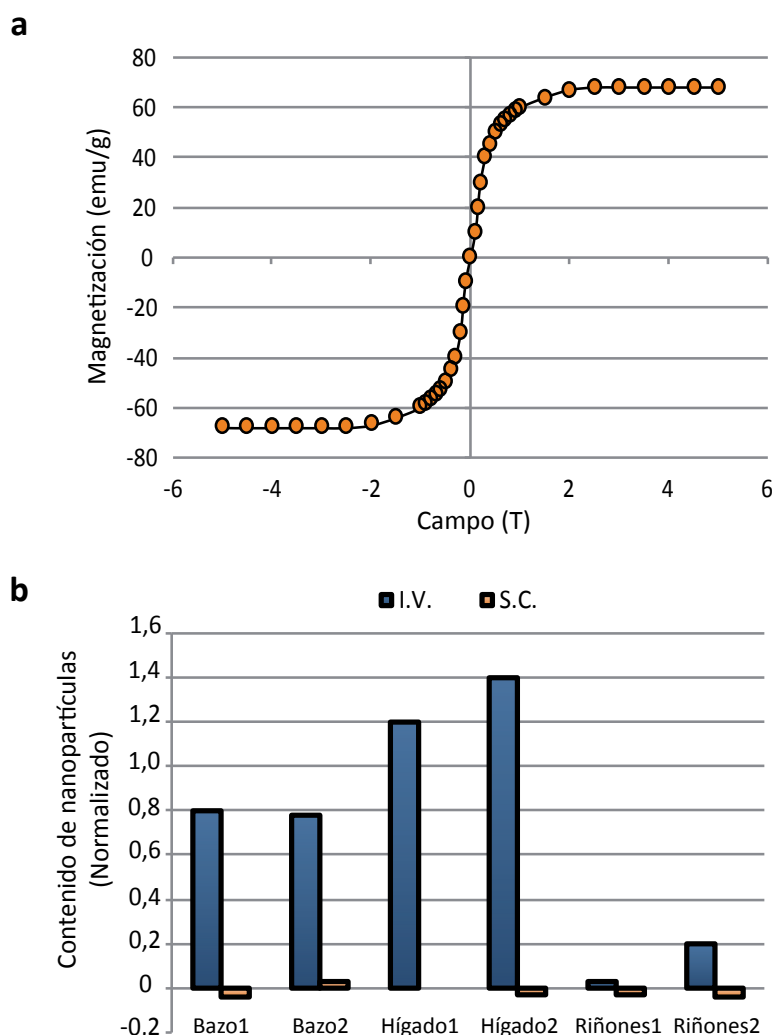


Figura R.15. Fracción de masa de DMSA-NP acumuladas en diferentes órganos tras su administración. a) Curva de magnetización de una muestra de DMSA-NP similar a las inyectadas en los ratones. Esta curva es necesaria para el cálculo de la fracción de masa que representan las nanopartículas en cada órgano analizado. **b)** Cuantificación de la fracción de masa de nanopartículas acumuladas respecto a la masa total de cada órgano, calculada a partir de las curvas de magnetización de los órganos (Figura R.14) comparadas con la curva obtenida de una muestra de DMSA-NP (aparatado a). Los números indican que las muestras fueron tomadas de ratones distintos.

3.3 Cambios en la biodistribución de las DMSA-NP tras la aplicación de un campo magnético externo.

Existen numerosos estudios sobre la biodistribución de distintos tipos de nanopartículas magnéticas en modelos animales de tumores (Lübbe et al., 1996a; Alexiou et al., 2000; Alexiou et al., 2003; Alexiou et al., 2006; Fernández-Pacheco et al., 2007; Chertok et al., 2010). En el caso concreto de **nanopartículas cubiertas de DMSA se ha observado que se acumulan preferencialmente en los pulmones, y en menor medida en hígado y bazo (Chaves et al., 2002)**. En estos estudios se demuestra que **la aplicación de un campo magnético externo conduce a la acumulación de nanopartículas en la zona de aplicación**, sin embargo los análisis se realizaron en ratones portadores de tumores, donde el efecto de permeabilidad y retención elevada (EPR) podría variar la biodistribución de las nanopartículas y su acumulación en los distintos tejidos (Maeda et al., 2000; Maeda et al., 2009). Además, dado que la adsorción



de una droga a la superficie de las nanopartículas puede modificar su tamaño y carga superficial, y estas características determinan la biodistribución, es posible que las partículas con y sin droga unida se comporten de forma diferente en términos de biodistribución. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, en el presente trabajo se han realizado estudios de biodistribución en ratones C57BL/6 no portadores de tumores, analizando la presencia de nanopartículas solas o unidas a IFN- γ con y sin aplicación de un campo magnético externo. Para ello se analizaron los órganos mediante **susceptibilidad magnética AC**. Este tipo de análisis **permite distinguir la respuesta producida por las nanopartículas acumuladas en los tejidos de la respuesta generada por otros componentes magnéticos como la ferritina, ya que cada compuesto presenta su máximo de repuesta a una temperatura distinta**. Además con este tipo de medidas se obtiene información no sólo de la **cantidad de nanopartículas magnéticas** presentes en los tejidos, sino también de su **estado de agregación** (López et al, 2007). Con este fin se compararon las medidas obtenidas de las muestras con otras generadas a partir de preparaciones de nanopartículas del mismo tipo a distintas concentraciones. Las muestras con un mayor estado de agregación presentaron su máximo a temperaturas más altas, debido a la proximidad entre partículas (Figura R.16)

Figura R.16

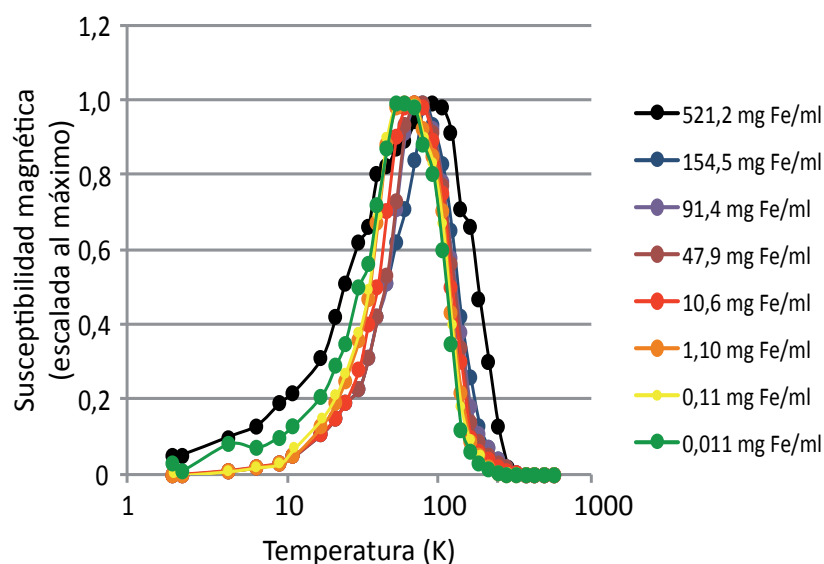


Figura R.16. Perfiles de susceptibilidad magnética de diluciones de DMSA-NP en agar a diferentes concentraciones. La muestras se prepararon a diferentes concentraciones, se analizó su susceptibilidad magnética y los resultados se escalan al máximo. Las muestras con mayor concentración y mayor estado de agregación generaron curvas más anchas y sus máximos se desplazaron hacia temperaturas más altas. Estos perfiles se utilizaron para cuantificar la cantidad de DMSA-NP presentes en los tejidos analizados mediante susceptibilidad magnética AC.

Para la realización de estos análisis los animales recibieron 1,5 mg de Fe (5 dosis repartidas en dos semanas) en forma de DMSA-NP (300 μ g de Fe en 100 μ l de PBS/dosis) o IFN- γ -DMSA-NP (10000 U IFN- γ + 300 μ g de Fe en 100 μ l de PBS/dosis) por vía intravenosa. Los ratones



que recibieron IFN- γ -DMSA-NP se dividieron en dos grupos (n=4/grupo), y a uno de ellos se le aplicó un campo de 0,4 Tesla en el flanco derecho. El campo magnético se mantuvo durante 1 hora tras cada dosis administrada. Tras el sacrificio se extrajeron diversos órganos (hígado, bazo, corazón cerebro, pulmones y riñones) y muestras de sangre, y se obtuvieron las curvas de susceptibilidad magnética para determinar la presencia de nanopartículas en ellos (Figura R.17).

Figura R.17

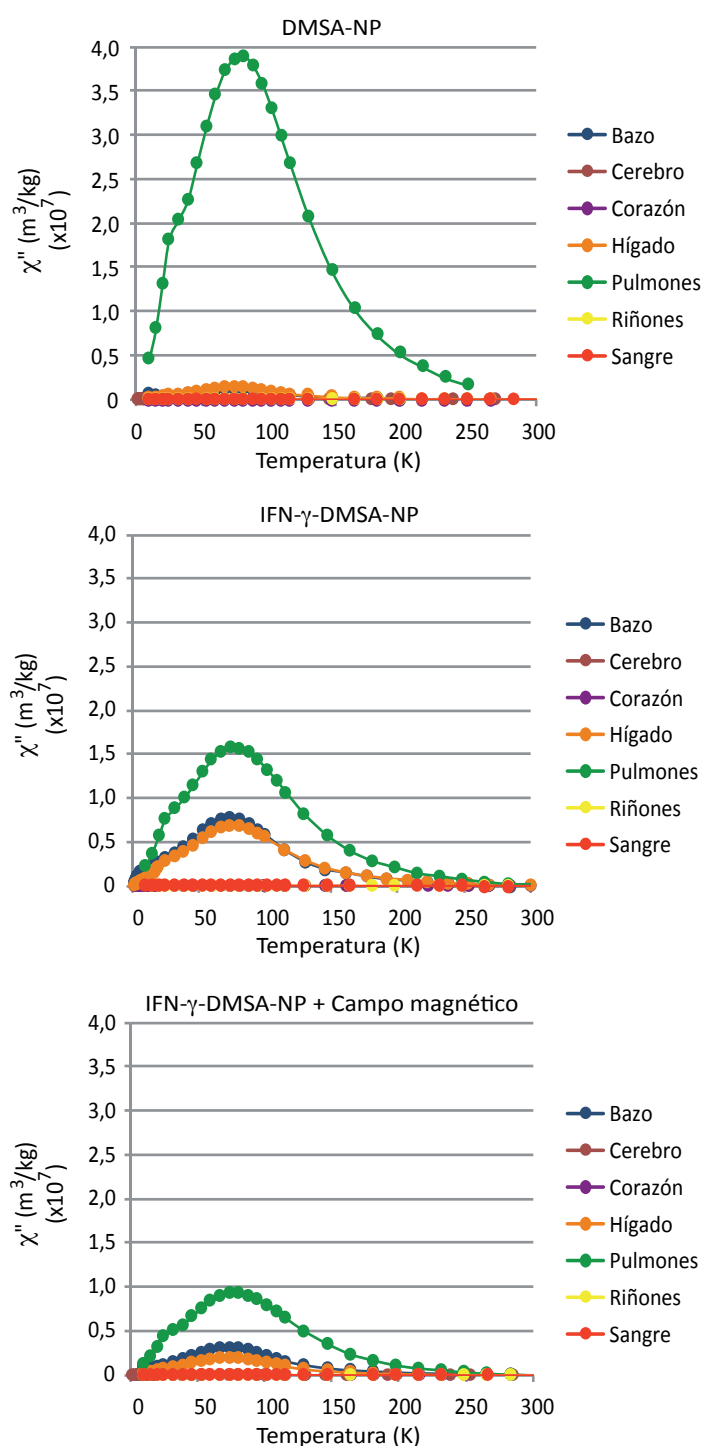


Figura R.17. Susceptibilidad magnética de los órganos extraídos de ratones tras la administración de nanopartículas magnéticas.

Los ratones recibieron cinco dosis de DMSA-NP (300 μ g Fe) o IFN- γ -DMSA-NP (300 μ g Fe + 10000 UI IFN- γ) sin y con aplicación de un campo magnético externo. La administración de los tratamientos se repartió a lo largo de dos semanas. Las muestras fueron liofilizadas y analizadas en un magnetómetro SQUID con opción de medidas AC. Se representa la susceptibilidad magnética fuera de fase (χ'') a distintas temperaturas.



Figura R.18

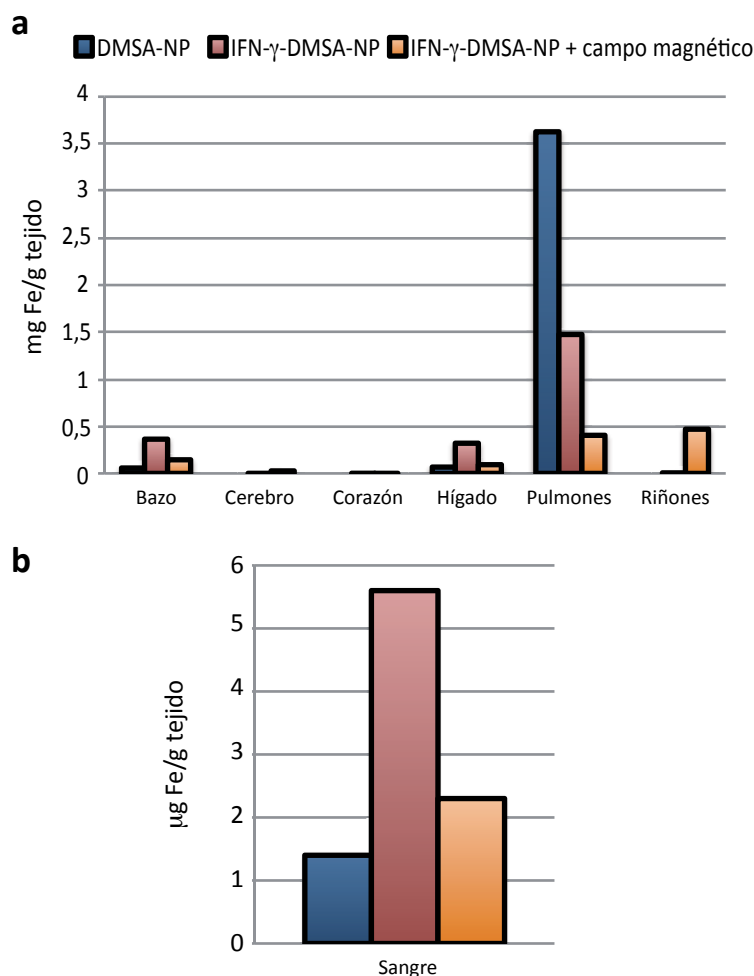


Figura R.18. Cuantificación de la cantidad de nanopartículas acumuladas en los distintos tejidos acumulados. Tras la obtención de los valores de susceptibilidad magnética de cada uno de los tejidos se calculó la cantidad de nanopartículas presentes en: **a)** los distintos órganos analizados, y **b)** la sangre extraída de los ratones tratados. Para ello se analizaron las curvas de susceptibilidad de cada muestra (Figura R.17) con los patrones de concentración conocida (Figura R.16). Los resultados se calcularon por unidad de masa de tejido analizado.

La cuantificación de los resultados obtenidos (Figura R.18a) mostró que las nanopartículas cubiertas de DMSA se acumularon principalmente en los pulmones (3,6 mg Fe/g tejido; 5,27% de las nanopartículas inyectadas), hígado ($6,7 \times 10^{-2}$ mg Fe/g tejido; 1,24%) y bazo ($5,7 \times 10^{-2}$ mg Fe/g tejido; 0,09%), como había sido descrito anteriormente (Chaves et al., 2002). La adsorción de IFN- γ a las DMSA-NP produjo un cambio en la biodistribución, reduciéndose la presencia de nanopartículas en los pulmones (1,5 mg Fe/g tejido; 3,22%), y aumentando la cantidad de nanopartículas acumuladas en hígado ($3,2 \times 10^{-1}$ mg Fe/g tejido; 5,19%) y bazo ($3,6 \times 10^{-1}$ mg Fe/g tejido; 0,55%). La disminución de la cantidad de nanopartículas presentes en los pulmones fue aún mayor al aplicar un campo magnético en la región del flanco derecho de un grupo de ratones (0,4 mg Fe/g tejido; 2,81%), disminuyendo también la cantidad de nanopartículas acumuladas en hígado ($9,2 \times 10^{-2}$ mg Fe/g tejido; 4,30%) y bazo ($1,4 \times 10^{-1}$



mg Fe/g tejido; 0,28%). La cantidad de nanopartículas presentes en otros órganos fue mucho menor, con niveles indetectables en cerebro y corazón, y pequeñas cantidades de DMSA-NP y de IFN- γ -DMSA-NP en los riñones ($9,3 \times 10^{-4}$ y $1,4 \times 10^{-4}$ mg Fe/g tejido respectivamente), que aumentaron al someter a los ratones a un campo magnético en el flanco derecho ($4,6 \times 10^{-1}$ mg Fe/g tejido; 0,03%), probablemente debido a la acumulación de partículas en la región del riñón derecho, cercano a la zona de aplicación.

Los niveles de nanopartículas en sangre (Figura R.18b) fueron mayores en los ratones a los que se administró IFN- γ -DMSA-NP ($5,6 \times 10^{-3}$ mg Fe/g tejido; 1,30% del total de nanopartículas inyectadas) comparados con los ratones que recibieron inyecciones de DMSA-NP ($1,4 \times 10^{-3}$ mg Fe/g tejido; 0,32%), lo que podría deberse a la neutralización de cargas superficiales de las nanopartículas, que aumentaría su tiempo de residencia en sangre. Al aplicar el campo magnético la cantidad de nanopartículas en sangre disminuyó ($2,3 \times 10^{-3}$ mg Fe/g tejido; 0,53%), lo que concuerda con el aumento en la acumulación de nanopartículas en otros tejidos.



4. Análisis de la eficacia del sistema de distribución localizada de IFN- γ en modelos animales.

4.1 Implantación quirúrgica de imanes.

Una de las posibilidades a la hora de aplicar un campo magnético para dirigir las nanopartículas a la región deseada es la implantación de dispositivos magnéticos permanentes en la zona de interés (Ritter et al., 1994; Rosengart et al., 2005; Yellen et al., 2005; Zheng et al., 2006; Avilés et al., 2008). Para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo se procedió a la implantación quirúrgica de imanes en la región subcutánea del flanco derecho de un grupo de ratones. En primer lugar se utilizaron imanes de Neodimio/Hierro/Boro cubiertos de oro, que es un material inerte, para evitar la toxicidad de los componentes del imán. En el plazo de una semana tras la implantación quirúrgica de estos dispositivos todos los ratones desarrollaron una potente reacción inflamatoria en la región de implantación, que presentaba la piel frágil y enrojecida, y vasodilatación visible en la zona. Los mismos resultados se obtuvieron tras la implantación de imanes similares a los anteriores pero con una capa adicional de recubrimiento de teflón.

El uso de imanes de Neodimio/Hierro/Boro cubiertos de acero quirúrgico, diseñados para la implantación de prótesis dentales, no generó esta reacción adversa. Sin embargo la implantación de imanes no resultó un método apropiado en nuestro caso debido a la aparición de otros problemas, como la atracción de los imanes entre sí, que obligó a tener a los animales en cubetas separadas. La presencia del imán supuso además un obstáculo a la hora de generar los tumores y monitorizar su crecimiento, debido a la atracción entre los imanes y el material necesario para inyectar las células tumorales y medir el tamaño del tumor. Por último la atracción entre los imanes implantados y las partes metálicas de las cubetas en las que se mantienen los animales generó heridas cutáneas en todos los ratones, por lo que se desechó la aplicación permanente de campos magnéticos mediante implantación quirúrgica de imanes, y se optó por la aplicación de un campo magnético externo.

4.2 Efectos del tratamiento en ratones portadores de tumores Pan02 subcutáneos.

Con el fin de evaluar la eficacia de este sistema de distribución de IFN- γ para inmunoterapia antitumoral, se eligió un modelo animal para la aplicación del tratamiento *in vivo*. **Los modelos murinos son los más utilizados en inmunología**, debido a que a pesar de que existen algunas diferencias, **la estructura general del sistema inmune de estos animales y la del sistema inmune humano es similar** (Mestas y Hughes, 2004). Se eligió un modelo basado en la inyección de líneas tumorales singénicas en ratones inmunocompetentes de fondo genético C57BL/6, en lugar de la implantación de xenotransplantes en ratones inmunodeficientes, ya



que nuestro fin es potenciar la respuesta inmune antitumoral. Por último se escogió la **línea Pan02, derivada de adenocarcinoma de páncreas**, debido a que este tipo de tumores son **poco inmunogénicos**, por lo que muy **raramente se eliminan espontáneamente**, y tienden a desarrollarse y diseminarse rápidamente (Hezel et al., 2006). Los adenocarcinomas pancreáticos suelen tener mal pronóstico y representan la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer (Jemal et al., 2010), con una tasa media de supervivencia de sólo 6 meses (Warshaw y Fernández del Castillo, 1992)

4.2.1 Variación del tamaño tumoral.

Una vez establecidos los tumores mediante inyección subcutánea de células Pan02, se comenzó la administración intravenosa de los tratamientos 2 veces a la semana durante dos semanas. Los ratones se dividieron en 5 grupos, que recibieron inyecciones de PBS como control, DMSA-NP, IFN- γ o IFN- γ -DMSA-NP. A todos los grupos se les aplicó un campo magnético externo de 0,4 Tesla durante una hora tras la administración de cada una de las dosis de tratamiento, excepto a uno de los grupos que recibió IFN- γ -DMSA-NP sólo. En cada sesión de tratamiento se monitorizó el tamaño tumoral mediante un calibre (Figura R.19).

Figura R.19

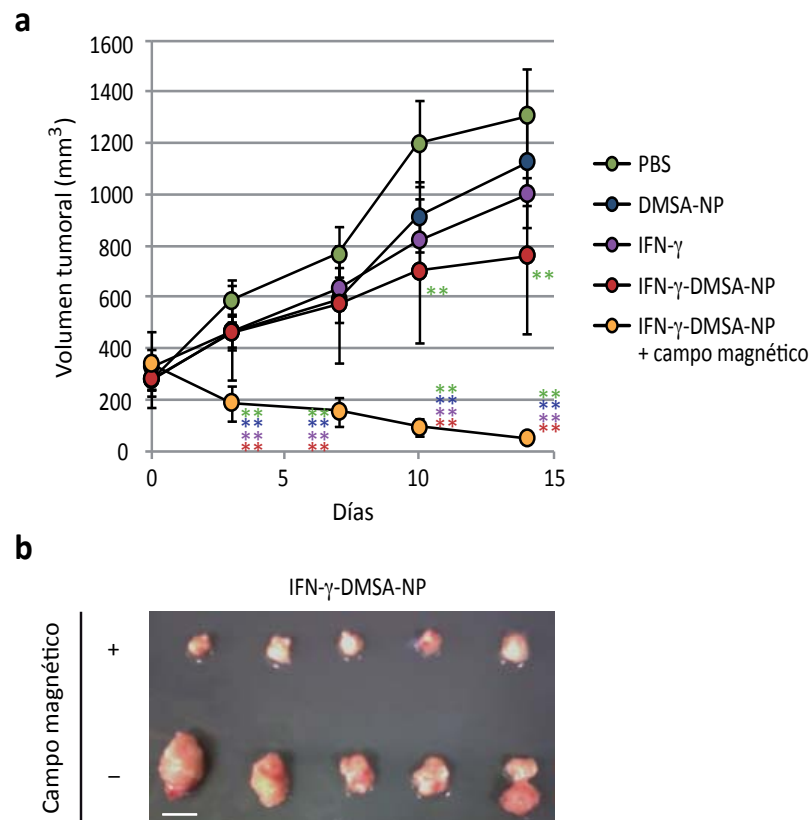


Figura R.19. Variación del tamaño de tumores de tipo Pan02 durante el periodo de tratamiento. a) Volumen tumoral medio en los distintos grupos de tratamiento. Los ratones recibieron una inyección subcutánea de $1,5 \times 10^6$ células Pan02, y tras una semana comenzó la administración de los tratamientos (PBS, IFN- γ , DMSA-NP, IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo), que se realizó dos veces por semana durante dos semanas. Los datos representan las medias \pm D.E. del volumen tumoral en mm³ frente al tiempo de tratamiento en días (*, p < 0,05; **, p < 0,001). b) Fotografía de los tumores extraídos de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo. Barra de escala: 1cm.



Se observó que en los ratones que recibieron inyecciones de PBS se alcanzó un volumen medio al final del tratamiento de $1306 \pm 309 \text{ mm}^3$. En los ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP el volumen tumoral fue de $761 \pm 290 \text{ mm}^3$, lo que supone una diferencia altamente significativa respecto al grupo control ($p = 6.3 \times 10^{-4}$). La aplicación externa del campo magnético en ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP condujo a una regresión de tamaño tumoral ($51 \pm 24 \text{ mm}^3$), con dos casos de remisión completa. Las diferencias en volumen tumoral fueron altamente significativas a partir del tercer día desde el inicio del tratamiento respecto al grupo tratado con PBS ($p = 3,6 \times 10^{-6}$) y al tratado con IFN- γ -DMSA-NP sin aplicación del campo magnético ($p = 5,5 \times 10^{-5}$). El tratamiento con DMSA-NP no produjo diferencias respecto a los controles tratados con PBS, mientras que en los ratones tratados con IFN- γ se observó una pequeña reducción en el tamaño tumoral medio tras el tratamiento ($1001 \pm 161 \text{ mm}^3$).

4.2.2 Acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral.

La eficacia observada durante el tratamiento sugiere que las nanopartículas de magnetita se habían localizado eficientemente en la zona del tumor tras la aplicación de un campo magnético externo. Para comprobar si ésto era cierto se utilizaron dos métodos de detección de nanopartículas en los tejidos. En primer lugar se realizó una tinción de azul de Prusia en cortes de tejido tumoral, que mostraron una mayor acumulación de nanopartículas en los tumores expuestos a un campo magnético (Figura R.20a). El porcentaje de área teñida en las secciones procedentes de tumores expuestos al campo magnético fue significativamente más alto que en los ratones a los que no se aplicó el campo magnético ($5,47 \pm 2,76\%$ y $0,98 \pm 0,59\%$ respectivamente, $p = 0,044$; Figura R.20b) y los ratones control ($0,44 \pm 0,26\%$, $p = 0,035$; Figura R.20b), que muestran la tinción de fondo correspondiente al hierro endógeno presente en el tejido.

Los tumores se analizaron también mediante medidas de susceptibilidad magnética (Figura R.21). Para los ratones a los que se administró PBS el perfil de respuesta muestra un máximo a 10 K que se corresponde con la señal generada por el hierro endógeno en forma de ferritina. Las señales obtenidas de tumores procedentes de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP sólo o con aplicación de campo magnético presentaron dos máximos, uno a 10 K, asociado al hierro endógeno, y otro alrededor de 100 K que se corresponde con la presencia de nanopartículas magnéticas. Al comparar estas señales con los patrones de partículas DMSA-NP preparados a distintas concentraciones (Figura R.16) se observó que la amplitud del máximo es mayor en el tejido, lo que indica que el grado de agregación de las partículas en el tumor es más alto que en los patrones. En este tipo de mediciones, el máximo de señal disminuye cuando aumenta el estado de agregación debido a un incremento en las interacciones dipolares (López et al., 2007), lo que explicaría que la señal obtenida en los tumores procedentes de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP y aplicación de campo magnético sea en apariencia menor que la obtenida en



los tumores del grupo al que se le administró IFN- γ -DMSA-NP sin campo magnético.

Figura R.20

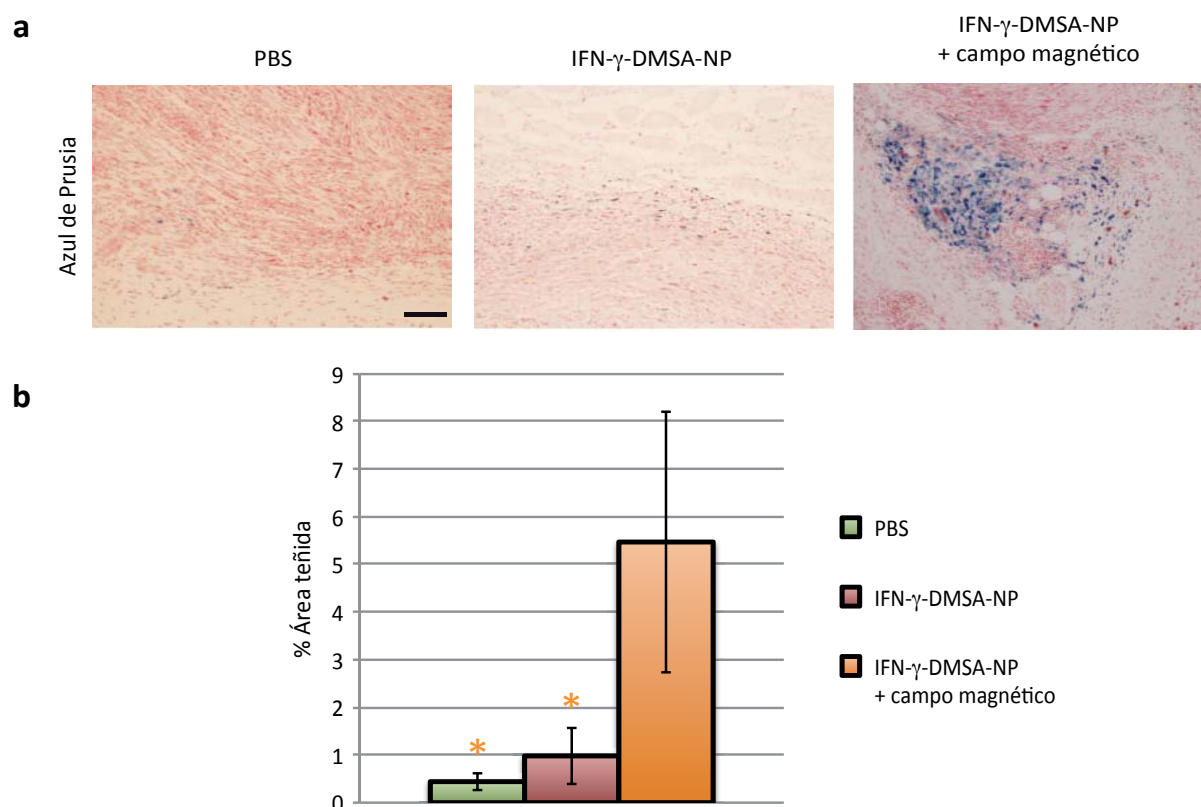


Figura R.20. Detección mediante tinción de azul de Prusia de las nanopartículas magnéticas acumuladas en los tumores tipo Pan02 tras el tratamiento. a) Se realizaron cortes histológicos de los tumores extraídos de los ratones tratados con PBS o IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo y se llevó a cabo una tinción de azul de Prusia, específica para la detección de hierro. Barra de escala: 100 μ m. **b)** Cuantificación del área teñida por campo (aumento x100). Los datos representan las medias \pm D.E. (*, $p < 0,05$).

4.2.3 Niveles de IFN- γ en sangre y en el tejido tumoral.

Para poder considerar eficaz el sistema de distribución de IFN- γ la acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral debe correlacionarse con un aumento en los niveles de citoquina en la zona. Para comprobar si las nanopartículas transportaron eficientemente el IFN- γ se midieron sus niveles en suero y el tejido tumoral mediante ELISA (Figura R.22). Las medidas mostraron un incremento en las muestras procedentes de ratones tratados con IFN- γ o IFN- γ -DMSA-NP. La cantidad de IFN- γ detectada en las muestras procedentes de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP y expuesto a un campo magnético fue menor. El tratamiento con DMSA-NP no produjo un aumento en los niveles de citoquina respecto a los controles tratados con PBS.



Figura R.21

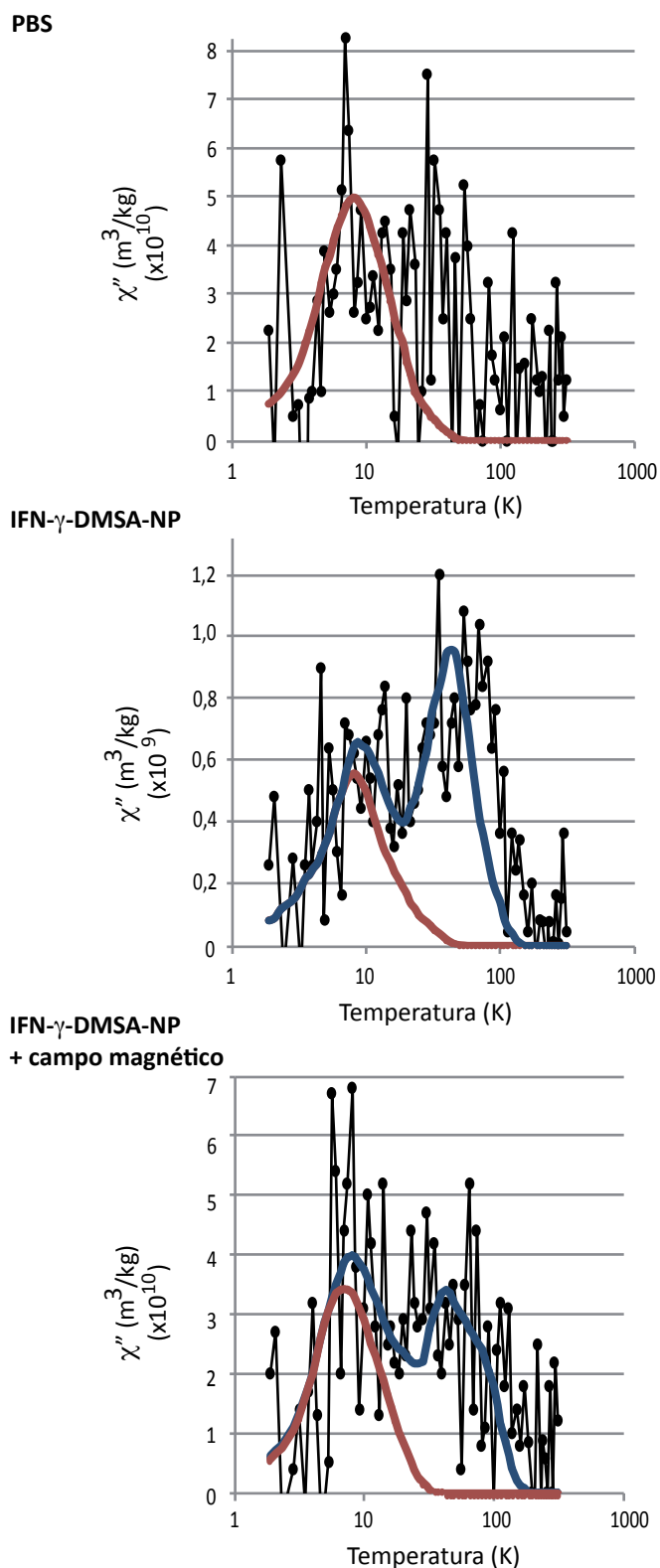


Figura R.21. Susceptibilidad magnética de los tumores tipo Pan02 extraídos de ratones tras el periodo de tratamiento. Los perfiles de susceptibilidad magnética del tejido tumoral (negro) extraídos de los ratones a los que se administraron los distintos tratamientos se obtuvieron mediante el análisis en un magnetómetro SQUID con opción de medidas AC. Se usó como referencia el perfil de hierro endógeno en forma de ferritina (rojo). La línea azul muestra la suma de las contribuciones del hierro endógeno y las nanopartículas.



Para determinar la cantidad de IFN- γ en la región de interés se extrajeron los tumores al final del periodo de tratamiento, y cada uno de ellos se dividió en pequeños fragmentos que se cultivaron en condiciones estándar durante 24 horas. Pasado este tiempo se recogió el medio de cultivo y se analizó mediante ELISA (Figura R.22). En los tumores procedentes de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP con aplicación de un campo magnético los niveles de IFN- γ fueron los más altos, mientras que con los tratamientos con IFN- γ o IFN- γ -DMSA-NP los niveles obtenidos fueron menores. De nuevo los niveles más bajos se detectaron en los ratones pertenecientes a los grupos tratados con DMSA-NP o PBS.

Figura R.22

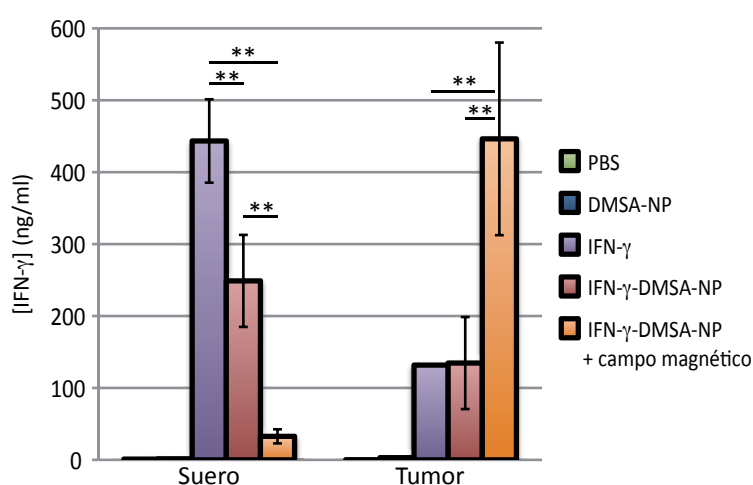


Figura R.22. Niveles de IFN- γ en muestras de suero y tumores de tipo Pan02. Las muestras se extrajeron de los ratones tras el periodo de tratamiento. Los tumores se cortaron en pequeños trozos y se cultivaron durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo. Tras este periodo se recogieron los sobrenadantes de medio de cultivo en el que se mantuvieron los tumores y se analizaron junto con las muestras de sangre mediante ELISA. Los datos representan las medias \pm D.E. (**, $p < 0,001$).

4.2.4 Efectos del IFN- γ en el ambiente tumoral.

Como se ha comentado en la introducción, el IFN- γ actúa principalmente a tres niveles en el proceso de control del desarrollo tumoral: reclutando e induciendo la activación de ciertas células inmunes efectoras a la zona, inhibiendo la angiogénesis e induciendo la muerte de las células tumorales mediante apoptosis (Ikeda et al., 2002). Para comprobar si la distribución localizada de IFN- γ en la región de interés induce estos efectos, se analizaron cortes de tejido tumoral procedente de los distintos grupos de tratamiento mediante inmunohistoquímica, para comprobar el grado de infiltración de células inmunes en la masa tumoral, el nivel de vascularización del tejido y la presencia de células tumorales apoptóticas.



4.2.4.1 Infiltración de células inmunes en el tumor.

La activación de la respuesta inmune antitumoral por parte del IFN- γ se traduciría en un aumento en la infiltración de células inmunes en el tejido tumoral. Para detectar la presencia de macrófagos en la masa del tumor se utilizó un anticuerpo anti-LAMP-2 (Figura R.23). El tratamiento con IFN- γ o IFN- γ -DMSA-NP indujo la acumulación de macrófagos en el tumor, siendo esta acumulación mayor cuando las partículas se dirigieron a la región mediante la aplicación de un campo magnético. La detección de células NK se realizó mediante un anticuerpo anti-Ly49G2, que es un receptor inhibidor presente en la mayor parte de las células NK activadas (Tay et al., 1999; Dokun et al., 2001; Kim et al., 2002). La acumulación de células NK aumentó en tumores procedentes de ratones tratados con IFN- γ , IFN- γ -DMSA-NP y IFN- γ -DMSA-NP con aplicación de un campo magnético, mientras que el tratamiento con DMSA-NP no produjo un incremento significativo en la infiltración de estas células respecto a los controles (Figura R.23). Resultados similares se obtuvieron tras la detección de células T infiltradas mediante el marcaje de cortes histológicos con un anticuerpo anti-CD3 (Figura R.23), con claras diferencias entre las muestras procedentes de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP y sometidos a un campo magnético, y el resto de grupos. Los resultados en conjunto indican que este tratamiento aumentó significativamente la infiltración de células inmunes en el tejido tumoral.

4.2.4.2 Efectos sobre la vasculatura tumoral.

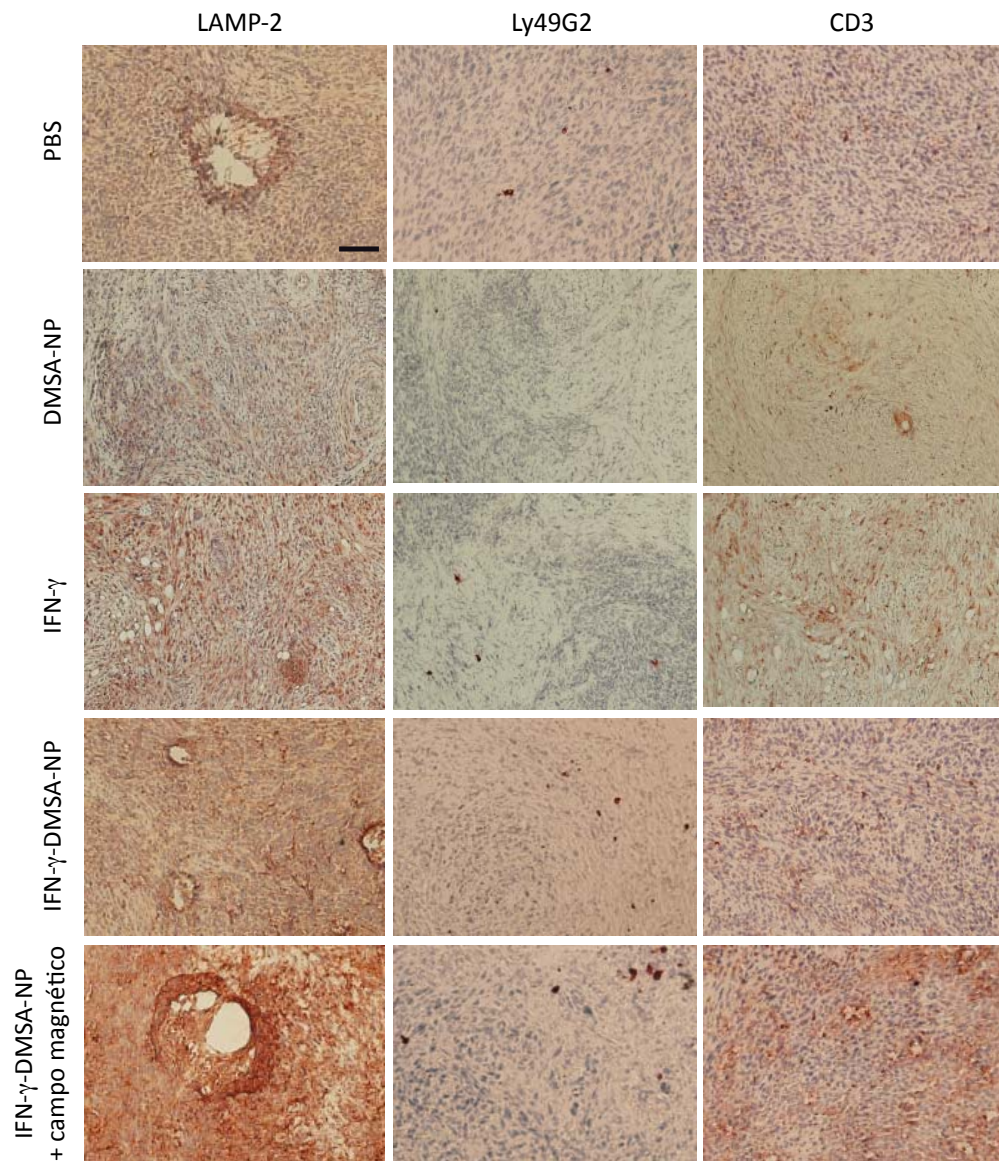
Para evaluar el efecto del IFN- γ en la angiogénesis se llevaron a cabo nuevas tinciones histológicas utilizando en este caso un anticuerpo anti-CD31, molécula de adhesión que se expresa a altos niveles en las células endoteliales y del que se ha sugerido un papel importante en el proceso angiogénico (Newman, 1994). A partir del marcaje en cortes histológicos se analizó el grado de vascularización de los tumores mediante la densidad de vasos (número de vasos/campo 100x) y el área vascular (% de área teñida/campo 100x).

Figura R.23. Infiltración de células del sistema inmune en los tumores de tipo Pan02 tras el tratamiento. a) Análisis mediante inmunohistoquímica de la infiltración de macrófagos (LAMP-2), células NK (Ly49G2), y células T (CD3) en tumores extrados de los ratones tratados con PBS, DMSA-NP, IFN- γ soluble, e IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo. Barra de escala: 100 μ m. **b)** Cuantificación del área teñida por campo (aumento 100x). Los datos representan las medias \pm D.E. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).



Figura R.23

a



b

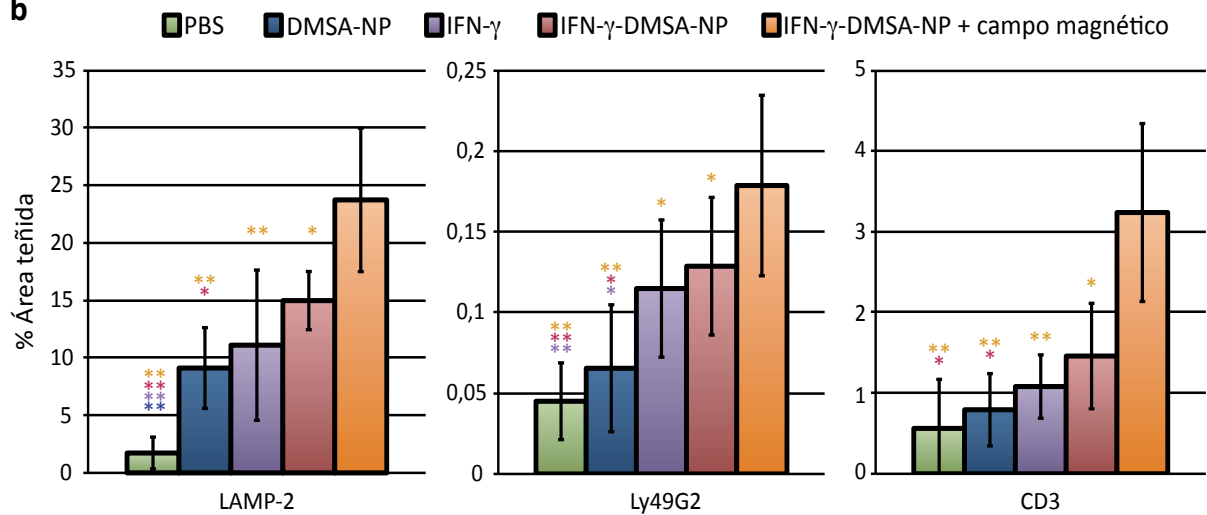
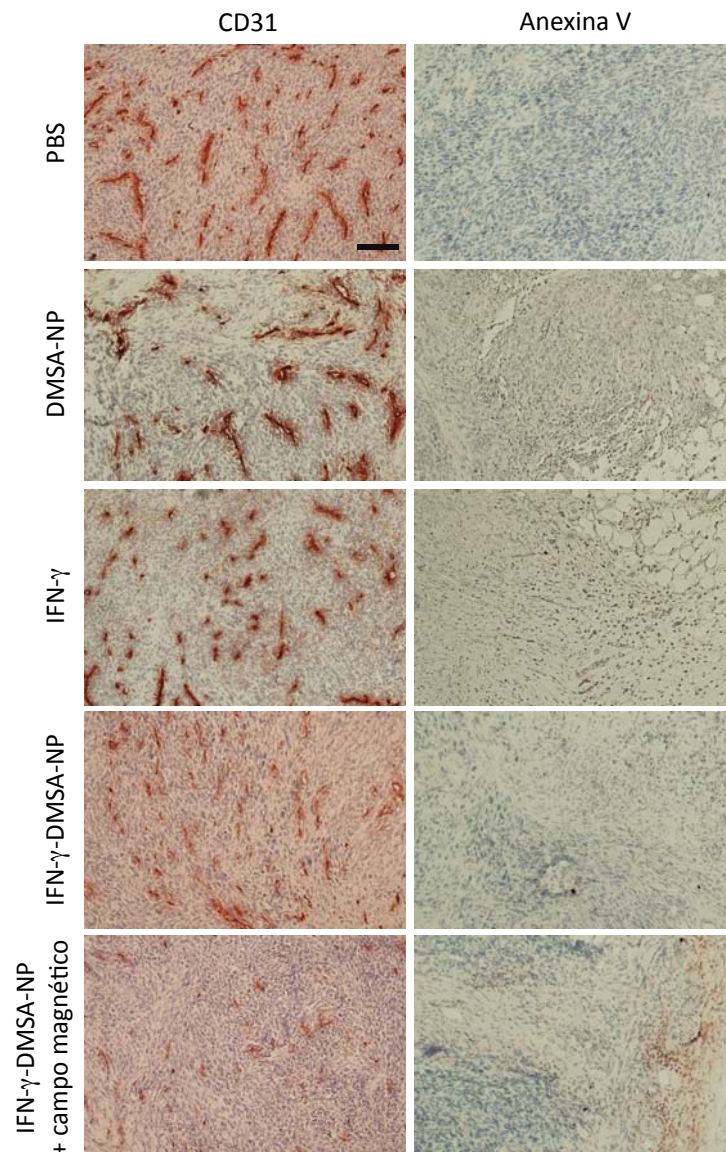


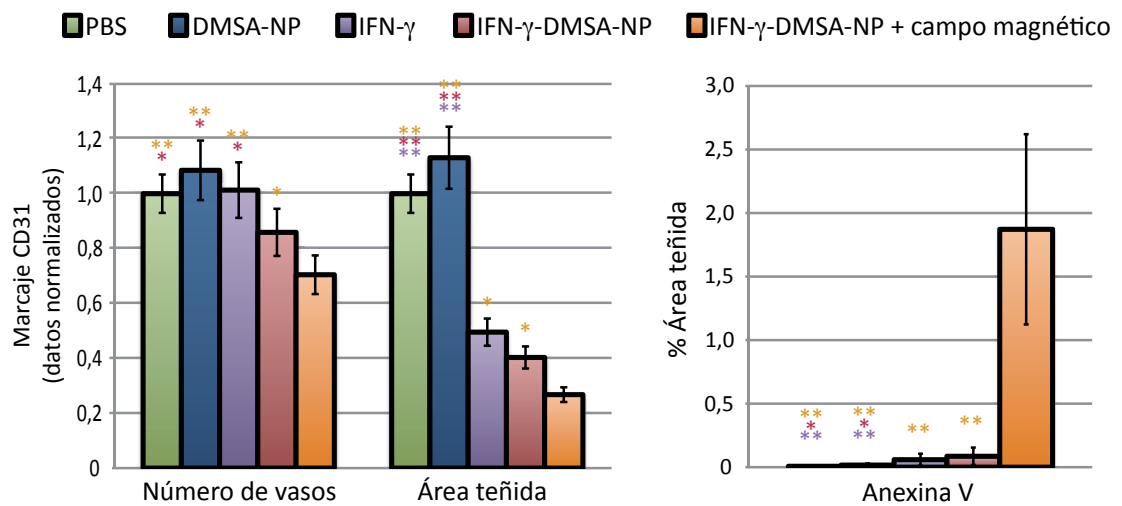


Figura R.24

a



b





Los tumores procedentes de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP sólo o con aplicación de campo magnético presentaron una menor densidad vascular comparados con los controles (Figura R.24), mientras que el área vascular fue menor en los casos en los que se administró IFN- γ , IFN- γ -DMSA-NP sólo o con aplicación de un campo magnético externo (Figura R.24), lo que indica que el tamaño de los vasos es menor en estos casos. Tanto el número de vasos como el área vascular de las muestras obtenidas del grupo tratado con DMSA-NP no presentaron diferencias respecto al grupo control tratado con PBS. Los resultados concuerdan con el papel antiangiogénico del IFN- γ .

4.2.4.3 Inducción de la apoptosis en el tumor.

Para determinar la importancia del efecto proapoptótico del IFN- γ administrado sobre los tumores Pan02 se realizó el marcaje con un anticuerpo anti-anexina V. Los niveles de anexina V detectados fueron bajos en todos los casos (Figura R.24), con un ligero incremento respecto a los controles en los grupos tratados con IFN- γ o IFN- γ -DMSA-NP, que fue mayor cuando en los ratones a los que se administró IFN- γ -DMSA-NP y sometidos a un campo magnético externo.

4.3 Efectos del tratamiento en ratones portadores de tumores inducidos por 3-metilcolantreno.

El modelo de inyección subcutánea de células tumorales no mimetiza exactamente el proceso de desarrollo y selección de un tumor en humanos. Este proceso se ve mejor reflejado en el caso de la inducción química de tumores, y por ello se decidió validar el sistema de distribución de IFN- γ para inmunoterapia antitumoral en ratones en los que se indujo la aparición de fibrosarcomas mediante la inyección subcutánea de una única dosis de 3-MCA. De la misma manera que en el caso de los ratones portadores de tumores Pan02, se dividieron en distintos grupos, utilizando en este caso aquellos tratamientos que habían demostrado tener mayor eficacia a la hora de controlar el crecimiento tumoral (IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de campo magnético) y el tratamiento con PBS como control. Al finalizar el periodo de tratamiento se analizaron los mismos aspectos que en el caso de los tumores Pan02, como el tamaño tumoral, la acumulación de nanopartículas y los niveles de IFN- γ en la región de interés, la infiltración de células inmunes, y los efectos antiangiogénicos y proapoptóticos en el nuevo tipo tumoral.



Figura R.24. Efecto antiangiogénico y proapoptótico del IFN- γ en los tumores tipo Pan02. a) Análisis mediante inmunohistoquímica del grado de vascularización (CD31) y de la apoptosis de las células tumorales (anexina V). El análisis se realizó en tumores extraídos de los ratones tratados con PBS, DMSA-NP, IFN- γ soluble, e IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo. Barra de escala: 100 μ m. b) Cuantificación del área teñida por campo (aumento 100x). Los datos representan las medias \pm D.E. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).



4.3.1 Variación del tamaño tumoral.

En los ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP y aplicación de un campo magnético externo el tamaño tumoral medio al final del periodo de tratamiento fue de $446 \pm 242 \text{ mm}^3$ (Figura R.25), lo que supuso una diferencia significativa respecto al grupo tratado con IFN- γ -DMSA-NP sólo ($2408 \pm 960 \text{ mm}^3$, $p = 0,008$) y al grupo control al que se administró PBS ($2565 \pm 701 \text{ mm}^3$, $p = 0,012$). A diferencia de lo observado en los tumores Pan02, la dirección e inmovilización de las nanopartículas cargadas con IFN- γ al área tumoral no produjo una regresión en el tamaño, si bien el tamaño tumoral no aumentó a lo largo del periodo de tratamiento.

Figura R.25

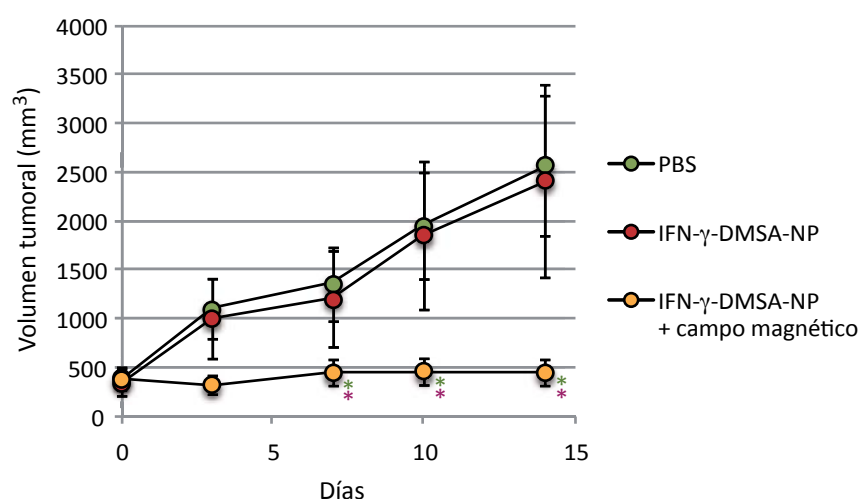


Figura R.25. Variación durante el periodo de tratamiento del tamaño de tumores inducidos mediante 3-MCA. Volumen tumoral medio en los distintos grupos de tratamiento. Los ratones recibieron una inyección subcutánea de $150 \mu\text{g}$ de 3-MCA. Cuando los tumores en desarrollo alcanzaron un volumen de 300 mm^3 comenzó la administración de los tratamientos (PBS o IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo), que se realizó dos veces por semana durante dos semanas. Los datos representan las medias \pm D.E. del volumen tumoral en mm^3 frente al tiempo de tratamiento en días (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).

4.3.2 Acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral.

De nuevo se utilizaron dos métodos para analizar la presencia de nanopartículas en el tejido tumoral. La tinción de cortes histológicos para la detección de hierro arrojó resultados similares a los obtenidos para los tumores Pan02, acumulándose una mayor cantidad de nanopartículas cuando se aplica un campo magnético sobre la región diana (Figura R.26a, b). Sin embargo el porcentaje de área teñida por campo es menor que en los tumores Pan02 (Figura R.26b). La tinción basal en los cortes procedentes de tumores control, que se corresponde con el hierro endógeno presente en el tejido, fue también menor que la observada en los tumores Pan02.



Figura R.26

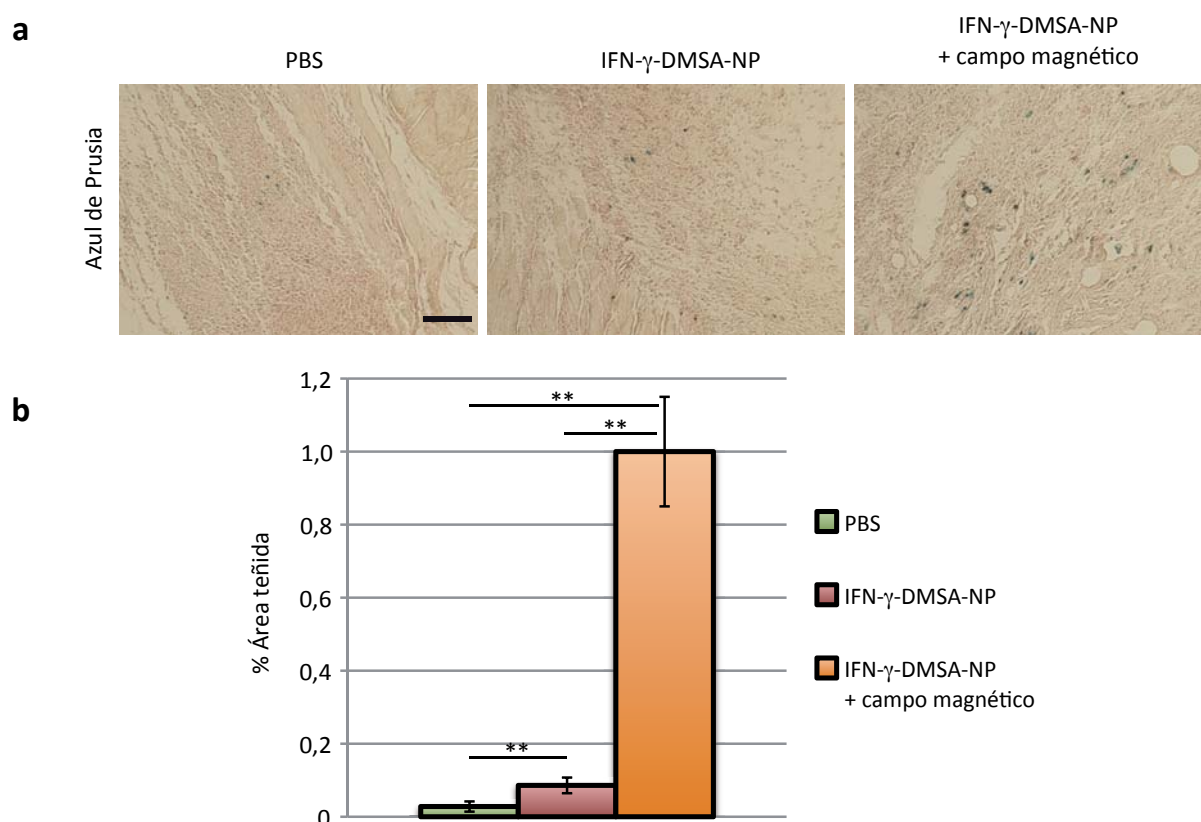


Figura R.26. Detección mediante tinción de azul de Prusia de las nanopartículas magnéticas acumuladas en los tumores inducidos por 3-MCA tras el tratamiento. a) Se realizaron cortes histológicos de los tumores extraídos de los ratones tratados con PBS o IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo y se llevó a cabo una tinción de azul de Prusia, específica para la detección de hierro. Barra de escala: 100 μ m. **b)** Cuantificación del área teñida por campo (aumento $\times 100$). Los datos representan las medias \pm D.E. (**, $p < 0,001$).

El análisis mediante susceptibilidad magnética AC confirmó las observaciones extraídas de la tinción de hierro, detectándose una mayor cantidad de nanopartículas en los tumores procedentes de ratones sometidos a un campo magnético externo (Figura R.27). En los tumores inducidos por 3-MCA la susceptibilidad magnética alcanzó valores más altos que en el caso de los tumores de tipo Pan02 tratados con IFN- γ -DMSA-NP y aplicación de campo magnético (Figuras R.21 y R.27). Esto puede explicarse debido a que los tumores inducidos químicamente fueron de mayor tamaño que los tumores generados por inyección de células Pan02, pudiendo estar las partículas más dispersas en el tejido tumoral, como de hecho parecen sugerir las tinciones de cortes histológicos (Figuras R.20 y R.26) y la mayor amplitud del máximo detectado mediante susceptibilidad AC en los tumores Pan02 respecto a los fibrosarcomas inducidos (Figuras R.21 y R.27), lo que sugiere una menor agregación de las nanopartículas en estos últimos.



Figura R.27

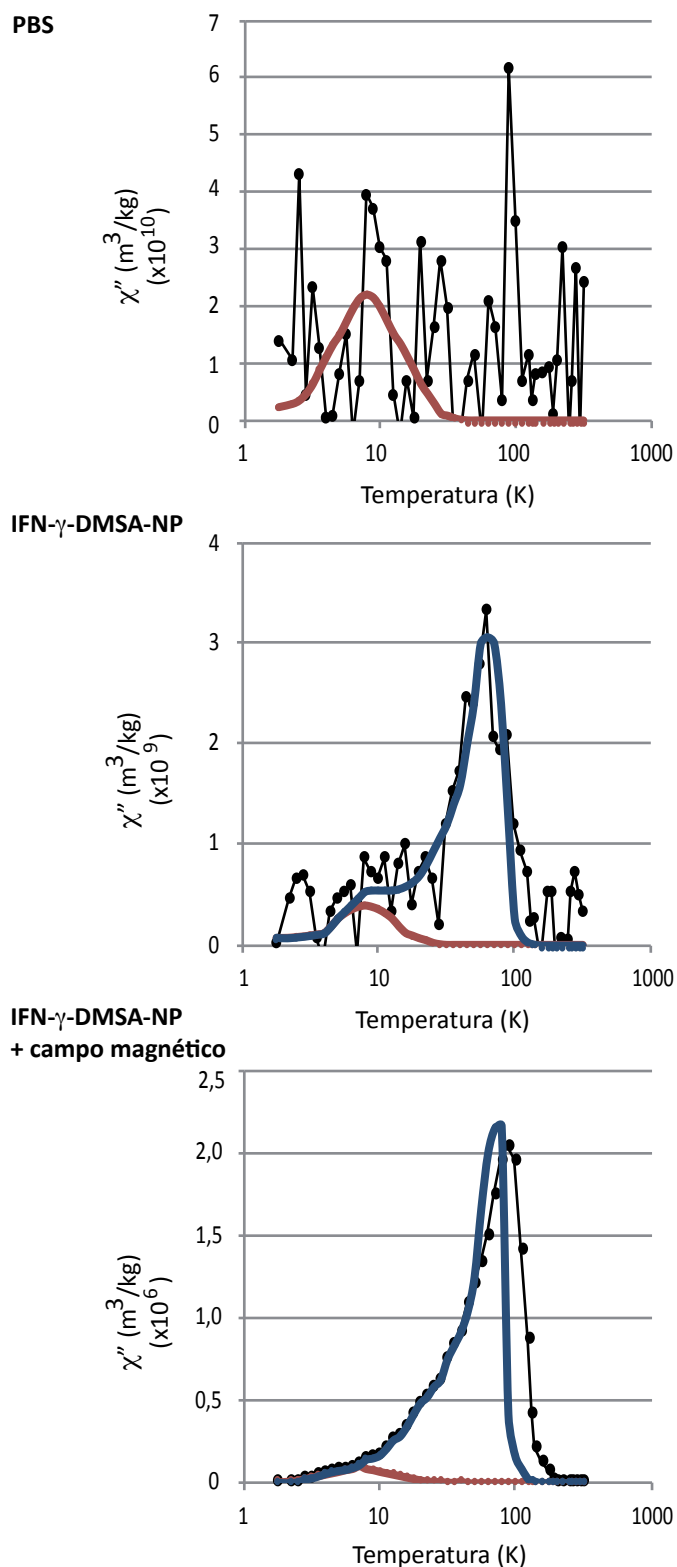


Figura R.27. Susceptibilidad magnética de los tumores inducidos por 3-MCA extraídos de ratones tras el periodo de tratamiento. Los perfiles de susceptibilidad magnética del tejido tumoral (negro) extraídos de los ratones a los que se administraron los distintos tratamientos se obtuvieron mediante el análisis en un magnetómetro SQUID con opción de medidas AC. Se usó como referencia el perfil de hierro endógeno en forma de ferritina (rojo). La línea azul muestra la suma de las contribuciones del hierro endógeno y las nanopartículas.



4.3.3 Niveles de IFN- γ en sangre y en el tejido tumoral.

El análisis de los niveles de IFN- γ en las muestras de sangre y el tejido tumoral extraídos arrojó resultados similares a los obtenidos anteriormente en el modelo de inyección de células Pan02. Los niveles más altos de citoquina en los tumores se obtuvieron en los casos en los que se administró IFN- γ y se aplicó un campo magnético (Figura R.28), mientras que en las muestras de sangre procedentes de estos mismos animales presentaron una menor cantidad de citoquina que en las muestras obtenidas de los ratones del grupo tratado con IFN- γ -DMSA-NP sólo. Por tanto, en este modelo tumoral la acumulación de nanopartículas en el tejido también se traduce en una mayor concentración de IFN- γ en el área tumoral.

Figura R.28

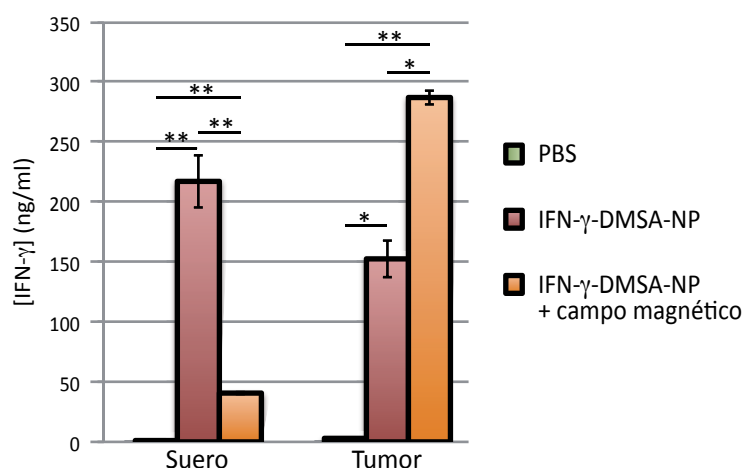


Figura R.28. Niveles de IFN- γ en muestras de suero y tumores inducidos por 3-MCA. Las muestras se extrajeron de los ratones tras el periodo de tratamiento. Los tumores se cortaron en pequeños trozos y se cultivaron durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo. Tras este periodo se recogieron los sobrenadantes de medio de cultivo en el que se mantuvieron los tumores y se analizaron junto con las muestras de sangre mediante ELISA. Los datos representan las medias \pm D.E. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).

4.3.4 Efectos del IFN- γ en el ambiente tumoral.

Mediante inmunohistoquímica se analizó la importancia de cada uno de los efectos del IFN- γ en los fibrosarcomas inducidos químicamente mediante 3-MCA.



4.3.4.1 Infiltración de células inmunes en el tumor.

La infiltración en el tejido tumoral de macrófagos y células T aumentó significativamente en los tumores procedentes de ratones tratados y expuestos a un campo magnético (Figura R.29) respecto a los tumores procedentes de ratones tratados sin aplicación de campo magnético y a los controles a los que se administró PBS. La presencia de células NK en el tumor fue mayor en los ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP y aplicación de un campo magnético respecto a los ratones tratados con PBS (Figura R.29), sin embargo no se observaron diferencias significativas al comparar los resultados con los obtenidos de los ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP sin campo magnético.

4.3.4.2 Efectos sobre la vasculatura tumoral.

El grado de vascularización en los tumores extraídos de ratones tratados con IFN- γ -DMSA-NP y aplicación de un campo magnético fue significativamente menor que el de los tumores del grupo control al que se administró PBS (Figura R.30). Si embargo se encontraron diferencias significativas ni en el número de vasos ni en el área vascular entre los grupos tratados con IFN- γ -DMSA-NP sin o con aplicación de campo magnético (Figura R.30). Teniendo en cuenta que las diferencias en el tamaño tumoral entre estos dos grupos fueron significativas (Figura R.25), los resultados sugieren que en el caso de los fibrosarcomas inducidos químicamente el efecto antiangiogénico de IFN- γ no resulta decisivo para el control del desarrollo tumoral.

4.3.4.3 Inducción de la apoptosis en el tumor.

La presencia de anexina V en la membrana de las células tumorales, que indica que están sufriendo un proceso apoptótico, se detectó a bajos niveles en todos los grupos de tratamiento (Figura R.30). Sin embargo las diferencias fueron significativas entre todos ellos (Figura R.30), lo que indica que la acumulación de IFN- γ en el tejido tumoral indujo el proceso apoptótico en las células que lo forman.



Figura R.29

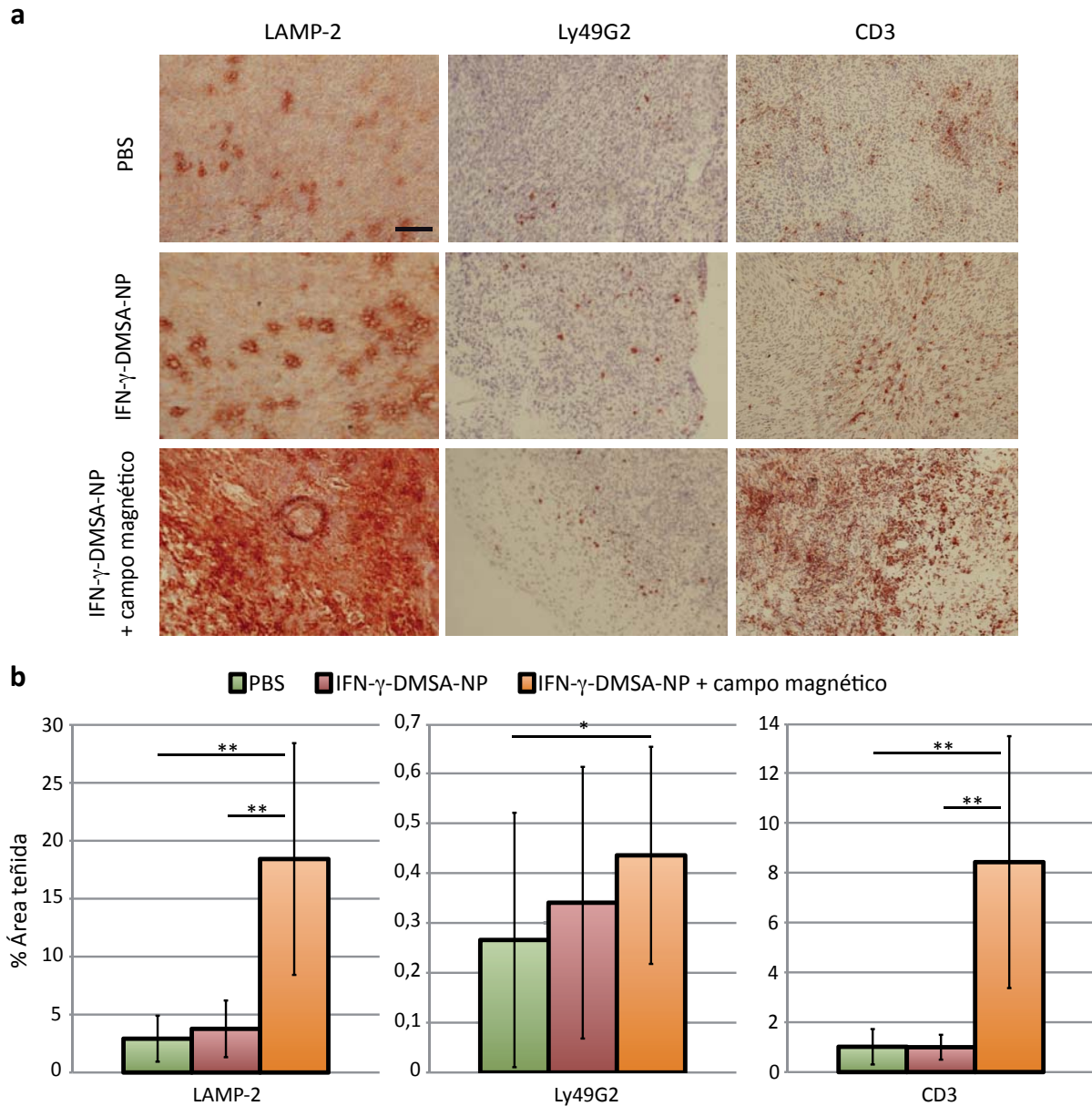


Figura R.29. Infiltración de células del sistema inmune en los tumores inducidos por 3-MCA tras el tratamiento. a) Análisis mediante inmunohistoquímica de la infiltración de macrófagos (LAMP-2), células NK (Ly49G2), y células T (CD3) en tumores extraídos de los ratones tratados con PBS, DMSA-NP o IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo. Barra de escala: 100 μ m. **b)** Cuantificación del área teñida por campo (aumento 100x). Los datos representan las medias \pm D.E. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).



Figura R.30

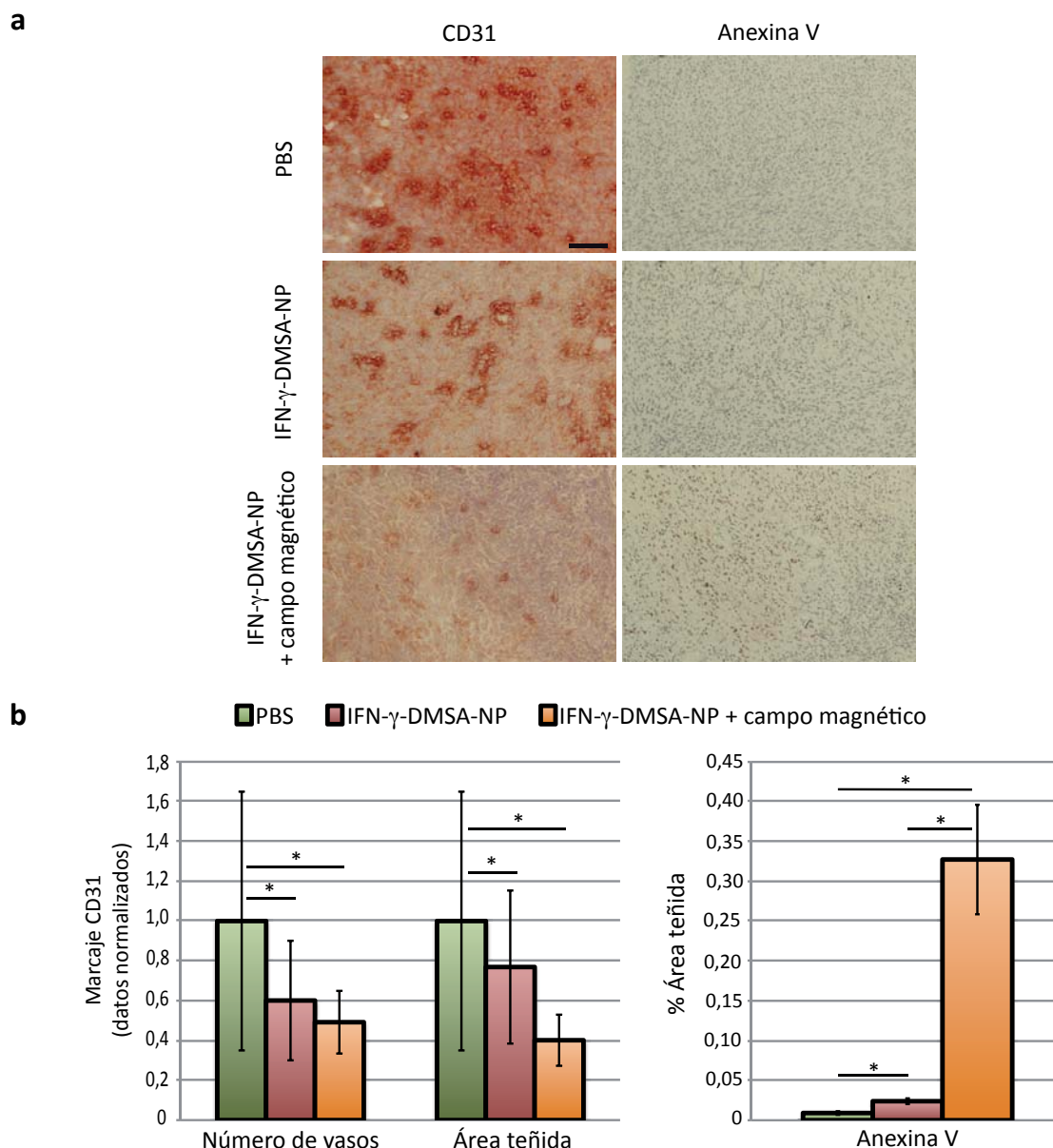


Figura R.30. Efecto antiangiogénico y proapoptótico del IFN- γ en los tumores tipo inducidos por 3-MCA. a) Análisis mediante inmunohistoquímica del grado de vascularización (CD31) y de la apoptosis de las células tumorales (anexina V). El análisis se realizó en tumores extraídos de los ratones tratados con PBS o IFN- γ -DMSA-NP sin y con aplicación de un campo magnético externo. Barra de escala: 100 μ m. **b)** Cuantificación del área teñida por campo (aumento 100x). Los datos representan las medias \pm D.E. (*, $p < 0,05$).

Estos resultados en conjunto confirman que la utilización de nanopartículas magnéticas dirigidas mediante un campo magnético externo resultaron ser un sistema de distribución localizada de IFN- γ eficaz en los dos modelos tumorales *in vivo* que hemos analizado.

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos no es ¡Eureka!, sino “Es extraño...”.

Isaac Asimov



Discusión



Uno de los principales problemas que presentan los tratamientos clásicos del cáncer, como la radio y quimioterapia, es que, como consecuencia de su aplicación sistémica, no sólo afectan al tumor, sino también a los tejidos sanos. El desarrollo de nuevas terapias que eviten estos efectos secundarios ha sido uno de los campos de investigación más activos en las últimas décadas. Una de las aproximaciones más prometedoras es la inmunoterapia, que se basa en potenciar la capacidad que tiene el sistema inmune de reconocer de manera específica las células tumorales (Smyth et al., 2001). La actuación del sistema inmune depende del balance de señales inhibitorias y activadoras que reciba en un momento dado. Entre estas señales se encuentran las citoquinas, que determinan el tipo de respuesta inmune que se va a producir y entre las que destaca por sus importantes efectos antitumorales el IFN- γ (Ikeda et al., 2002). El IFN- γ activa e induce la infiltración de células efectoras del sistema inmune como macrófagos, células NK y células T CD4⁺ y CD8⁺ e induce una mayor inmunogenicidad de las células tumorales aumentando la expresión de MHC clase I y II (Weber y Rosenberg, 1988; Mach et al., 1996). El IFN- γ posee también otros efectos no inmunes, pero que participan en el control del crecimiento tumoral, como su acción antiangiogénica o su efecto proapoptótico sobre las células tumorales (Lu et al., 2009; Xu et al., 1998; Detjen et al., 2001). La utilización de IFN- γ como posible agente terapéutico en el pasado no ha tenido los efectos esperados, fundamentalmente por la dificultad a la hora de conseguir una dosis terapéuticamente relevante en el área de interés, sin generar efectos adversos en los tejidos sanos (Younes y Amsden, 2002). Para soslayar estas dificultades se ha realizado un gran esfuerzo en los últimos años para desarrollar nuevos sistemas de administración de drogas que consigan dirigirlas específicamente a la zona diana minimizando la toxicidad sistémica. La administración intratumoral genera altos niveles de citoquina a nivel local, lo que conduce a un mayor efecto antitumoral y a una disminución en los efectos secundarios (Thom et al., 1992; Schneider et al., 1998). Sin embargo la administración intratumoral puede presentar ciertos problemas, como el hecho de que los tumores pueden ser de difícil acceso según su localización, lo que podría dificultar la administración de droga. Además, la inyección intratumoral suele ser dolorosa y conlleva riesgos de diseminación de células tumorales e infección (Wenig et al., 2002). Por otra parte, a pesar de la disminución de los efectos secundarios obtenida gracias a la administración intratumoral de IFN- γ , se ha observado que parte de los efectos tóxicos se mantienen debido a que la citoquina administrada puede difundir y alcanzar tejidos sanos (Younes y Amsden, 2002). Estos problemas han sido superados en parte, gracias al uso de liposomas, geles y microesferas biodegradables en los que se incluye la droga de interés y que han sido testados como métodos de distribución de IFN- γ . El principal problema a la hora de utilizar estos compuestos es la baja eficiencia de unión de IFN- γ , y la pérdida de estabilidad y función del IFN- γ en el proceso de síntesis (revisado en Younes y Amsden, 2002). El desarrollo de la nanobiotecnología proporciona interesantes herramientas que pueden ayudar a conseguir los objetivos fundamentales de la terapia antitumoral. La



utilización de nanopartículas como agentes transportadores de fármacos ha proporcionado resultados prometedores en el tratamiento de distintos tipos de tumores ([Moghimi et al., 2001](#); [Brigger et al., 2002](#); [Singh y Lillard, 2009](#); [Chen et al., 2010](#)).

En este trabajo se ha propuesto la utilización de partículas magnéticas para distribuir IFN- γ . Este tipo de sistema permite la administración por vía intravenosa y puede dirigirse e inmovilizarse en la zona de interés gracias a la utilización de un campo magnético externo. La citoquina se ha adsorbido a la superficie de distintos tipos de nanopartículas magnéticas mediante interacción electrostática. Numerosos estudios previos indican que es posible conseguir la adsorción de proteínas a la superficie de nanopartículas ([Kingsley et al., 2006](#); [Cai et al., 2008](#); [Seagrave, 2008](#)), y en algunos casos se ha utilizado como estrategia a la hora de generar partículas capaces de distribuir drogas antitumorales en modelos preclínicos y clínicos ([Lübbe et al., 1996a](#); [Lübbe et al., 1996b](#); [Alexiou et al., 2000](#); [Alexiou et al., 2007](#); [Lyer et al., 2010](#)). La interacción depende no sólo de las características de las partículas y la proteínas, sino también de las propiedades del medio en el que se encuentran ([Arias et al., 2008](#); [Gaihre et al., 2009](#)). En el presente estudio se han analizado los factores que afectan a la interacción electrostática entre el IFN- γ y distintos tipos de nanopartículas magnéticas. El IFN- γ murino presenta carga positiva a pH fisiológico, por lo que es necesario utilizar nanopartículas magnéticas con carga negativa en superficie para conseguir la interacción. Los resultados obtenidos indican que factores como el pH y la fuerza iónica del medio, el tiempo de incubación, las características fisicoquímicas de las nanopartículas y la naturaleza de su cubierta pueden afectar a la interacción. Se ha obtenido una eficiencia máxima de carga del 90% en el caso de partículas magnéticas cubiertas de ácido dimercaptosuccínico y dextrano. Este dato sugiere que la naturaleza de las nanopartículas afecta a la interacción electrostática no sólo en función de su carga, pues nanopartículas con mayor carga negativa condujeron a una menor eficiencia en la interacción. Las nanopartículas cubiertas con aminodextrano, con carga superficial positiva, no unieron citoquina. Para posteriores ensayos se optó por la utilización de las nanopartículas magnéticas cubiertas de ácido dimercaptosuccínico, ya que mostraron una alta eficiencia en la captación de IFN- γ y presentan propiedades magnéticas mejoradas respecto a las partículas cubiertas de dextrano, debido al método de síntesis utilizado en cada caso ([Tartaj et al., 2003](#)).

Como se ha comentado, uno de los problemas al utilizar sistemas de distribución de drogas como los que se proponen en este trabajo es la pérdida de estabilidad y función de la droga en el proceso de interacción. Por ese motivo se ha comprobado mediante ensayos de activación de macrófagos murinos primarios que la funcionalidad del IFN- γ no se ve alterada tras la interacción con las nanopartículas magnéticas, y que no es necesaria la desorción de la citoquina para que el IFN- γ induzca sus efectos, lo que elimina la necesidad de añadir un paso de liberación de la



proteína en el proceso, y permite que el IFN- γ actúe desde el momento en que llega a la zona de interés.

El desarrollo de nuevos procedimientos en biomedicina conlleva la necesidad de determinar los riesgos que pudieran derivarse de su uso. En el caso de la nanotecnología es especialmente importante, debido a que la relación superficie/masa de las nanopartículas es muy alta, lo que las hace muy reactivas. En trabajos previos se ha comprobado que determinados tipos de partículas pueden ejercer efectos citotóxicos, disminuyendo la viabilidad, y la capacidad de adhesión y división celular (Pernodet et al., 2006; Lipski et al., 2008; Villanueva et al., 2009). Estos efectos dependen fundamentalmente de su captación e internalización en los distintos tipos de células, lo que a su vez depende de características propias de las nanopartículas, como su composición química, su tamaño y forma, la naturaleza de su cubierta, su carga superficial, su cristalinidad, el estado de agregación, su hidrofobicidad o hidrofiliidad, su grado de oxidación y de degradación (Nel et al., 2009; Hillaireau y Couvreur, 2009; Krishnan, 2010). Otro aspecto que va a determinar el tipo de efecto tóxico que pueden producir las nanopartículas en las células es su destino al ser internalizadas (Nel et al., 2009). Existen estudios previos que indican que la presencia de nanopartículas de óxido de hierro cubiertas de ácido dimercaptosuccínico no produce efectos genotóxicos ni disminuye significativamente la viabilidad celular en fibroblastos humanos o células HeLa (Auffan et al., 2006; Villanueva et al., 2009), ni afecta al citoesqueleto de estas últimas (Villanueva et al., 2009).

En el presente trabajo se han analizado los posibles efectos tóxicos directos e indirectos de las nanopartículas cubiertas de ácido dimercaptosuccínico en células Pan02 en cultivo. No se han observado efectos adversos sobre el metabolismo celular, ni alteraciones en la forma de las células, en la organización del citoesqueleto o en la división celular, a pesar de que las nanopartículas se internalizan en las células Pan02. Se ha comprobado además que las nanopartículas permanecen en el compartimento lisosomal de estas células, lo que podría proteger a otros componentes celulares de los efectos que estas nanopartículas pudieran tener sobre ellos. La adsorción de IFN- γ a la superficie de las nanopartículas disminuye la captación por parte de las células, de forma que las nanopartículas permanecen en la región extracelular, probablemente debido a la disminución de la carga superficial efectiva de las nanopartículas. Dado que la citoquina que hemos utilizado actúa sobre receptores de membrana, este resultado es de especial importancia para que el IFN- γ pueda ejercer sus funciones sobre las células con las que entre en contacto.



Con vistas a su utilización en organismos vivos, el estudio de la biodistribución y biocompatibilidad de las nanopartículas magnéticas es esencial. La biodistribución de las nanopartículas depende de aspectos como las propiedades de su superficie, su tamaño, la forma y la concentración de las nanopartículas (Jain et al., 2008; Chouly et al., 1996, Owens y Peppas, 2006; Kunath et al., 2002; Panagi et al., 2001). Los estudios de biodistribución del presente trabajo se han realizado, a diferencia de los trabajos anteriormente publicados, en ratones sanos no portadores de tumores. Se ha considerado que la presencia de tumores podría producir cambios en la biodistribución de las nanopartículas, que tenderían a acumularse en el tejido tumoral en lugar de acumularse en otras regiones, lo que podría enmascarar posibles efectos secundarios.

En estudios previos en los que se ha analizado la biodistribución de nanopartículas magnéticas cubiertas de ácido dimercaptosuccínico, se había establecido que el órgano en el que se acumulan estas partículas preferencialmente es el pulmón (Chaves et al., 2002), por lo que estas partículas podrían generar procesos patológicos debido a la migración transendotelial de células inmunes al parénquima pulmonar (García et al., 2005), generando un proceso inflamatorio agudo que podría causar daño tisular (Valois et al., 2009; Valois et al., 2010). El análisis de la biodistribución de las nanopartículas magnéticas cubiertas de ácido dimercaptosuccínico que se ha realizado en este trabajo ha arrojado resultados similares a los anteriormente descritos, con acumulación de nanopartículas en el tejido pulmonar, y en los órganos por los que se suelen eliminar estas partículas, como son el hígado y el bazo. Sin embargo, dado que la carga y el tamaño de las partículas son aspectos básicos que determinan el destino de las nanopartículas, y estos varían al adsorber nuestra proteína de interés a la superficie de las nanopartículas, se ha analizado también la distribución de estas tras la interacción con el IFN- γ . En este caso las partículas se acumulan en menor medida en los pulmones disminuyendo el riesgo de daño tisular, y aumenta su presencia en hígado y bazo. Las nanopartículas aparecen además en una mayor concentración en sangre, probablemente debido a que aumenta su tiempo de residencia en el torrente sanguíneo por la neutralización parcial de la carga superficial de las nanopartículas, lo que podría aumentar las posibilidades de llegar a la región de interés. Durante el periodo de administración sistémica de las nanopartículas magnéticas no se han observado signos de malestar animal o toxicidad, y tras el sacrificio de los animales no se encontraron alteraciones en los órganos típicos de eliminación de estas partículas, como hepatomegalia o esplenomegalia, ni alteración en la coloración o el aspecto de los tejidos, por lo que se consideró que la administración de las nanopartículas en este modelo animal es segura.

La acumulación de las nanopartículas en la región tumoral se puede conseguir de forma pasiva por la tendencia que tienen a acumularse en estas zonas debido a un efecto de permeabilidad y retención aumentada, ya que en el ambiente tumoral la permeabilidad vascular es mayor, lo



que permite la extravasación de las partículas (Jang et al., 2003), y a una disminución en el drenaje linfático de la zona (Maeda et al., 2009). Este efecto permite la acumulación pasiva de nanopartículas entre 100 y 1000 nm en el tejido tumoral, aunque el efecto de permeabilidad y retención depende del tipo de tumor. Por lo general se tiende a utilizar los tamaños de partícula más pequeños, ya que favorecen un mayor tiempo de residencia en sangre y la posibilidad de alcanzar regiones más profundas en la masa tumoral. Sin embargo se han realizado estudios que se inclinan por el uso de nanopartículas de tamaño hidrodinámico algo mayor (~ 350 nm), ya que son mejor retenidas en los tumores (Kommareddy y Amiji, 2007) debido a que difunden con dificultad, y además se evita su rápida eliminación de la circulación sanguínea por vía renal (Neuberger et al., 2005; Veiseh et al., 2010). En el presente estudio se han utilizado nanopartículas magnéticas de un tamaño hidrodinámico cercano a 100 nm, que tras la adsorción de citoquina en su superficie alcanzaron un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 400 nm, lo que debe favorecer su retención en el tejido tumoral de forma pasiva. No obstante, numerosos estudios se decantan por la utilización de estrategias activas para dirigir las nanopartículas con mayor eficiencia a la región de interés. La unión de anticuerpos o ligandos específicos del tejido diana a la superficie de las nanopartículas es el método que más se ha utilizado hasta la fecha, sin embargo se ha publicado que la utilización de estas moléculas específicas no aumenta la cantidad de nanopartículas en la zona tumoral respecto a la estrategia pasiva, pero sí supone un incremento en la capacidad de las nanopartículas de ser endocitadas (Bartlett et al., 2007; Kirpotin et al., 2006).

En el presente trabajo se ha optado por la aplicación de un campo magnético externo como estrategia activa de acumulación de nanopartículas magnéticas en el tejido diana. Varios estudios previos coinciden en la utilización de esta estrategia (Lübbe et al., 1996a; Alexiou et al., 2000; Alexiou et al., 2003; Alexiou et al., 2006; Fernández-Pacheco et al., 2007; Chertok et al., 2010; Wu et al., 2007). Estos estudios *in vivo* demuestran que la aplicación de un campo magnético sobre la zona en la que se encuentra un tumor produce la acumulación de nanopartículas magnéticas en el tejido tumoral y que la acumulación de nanopartículas depende de la intensidad de campo magnético utilizada (Alexiou et al., 2002). Estos cambios en la biodistribución de las nanopartículas magnéticas se han producido también en animales sanos, no portadores de tumores, como demuestran algunos estudios realizados en ratas mediante el análisis histológico y tinción de azul de Prusia (Wu et al., 2007). Los imanes utilizados en el presente trabajo presentan una intensidad de campo de 0,4 Tesla, suficiente para atraer a las nanopartículas al área de interés (Alexiou et al., 2002), como se ha podido comprobar en este trabajo, en el que la aplicación de un campo magnético ha modificado la biodistribución de las nanopartículas, disminuyendo la cantidad de éstas en sangre y en la mayor parte de los órganos analizados, y aumentando en los tejidos cercanos a la región de aplicación del campo magnético.



Una de las posibilidades a la hora de aplicar un campo magnético con el fin de atraer las nanopartículas magnéticas a la región de interés es la implantación quirúrgica de imanes o de dispositivos magnetizables permanentes en la zona. Esta aproximación se ha utilizado con éxito en el pasado, observándose un aumento en la cantidad de partículas acumuladas en las regiones cercanas al imán (Rosengart et al., 2005; Yellen et al., 2005; Zheng et al., 2006; Avilés et al., 2008). En estudios previos se ha propuesto la implantación de imanes similares a los utilizados en este trabajo mediante laparoscopia directamente en los órganos afectados (Fernández-Pacheco et al., 2007; Fernández-Pacheco et al., 2009). La implantación de estos imanes en el tejido renal de un grupo de conejos produjo una mayor acumulación de nanopartículas magnéticas en los riñones en los que se implantó el imán. En este caso la implantación de imanes fue bien tolerada y no se observó reacción inflamatoria ni efectos adversos. En el presente estudio la implantación subcutánea de imanes en ratones C57BL/6 produjo una potente reacción inflamatoria y problemas prácticos a la hora de realizar los procedimientos y de manejo de los animales, por lo que esta estrategia se abandonó y se optó por la aplicación externa del campo magnético. No obstante, esta estrategia puede ser de gran utilidad en casos en los que el área de interés se encuentre en regiones internas del organismo.

Todas estas observaciones llevan a pensar que en el caso de ratones portadores de tumores las nanopartículas magnéticas utilizadas en este trabajo se acumularían en el tejido tumoral gracias al efecto de permeabilidad y retención, al tamaño de las nanopartículas utilizadas (400 nm), que dificultaría su difusión y fundamentalmente a la aplicación de un campo magnético externo. Los análisis realizados han confirmado que estos aspectos conducen a la acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral tanto en el caso de tumores generados a partir de la inyección de la línea celular Pan02 como en tumores inducidos químicamente mediante la administración de 3-MCA por vía subcutánea. Sin embargo, existen diferencias en la acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral entre ambos modelos, lo que podría explicarse por las diferencias en la vascularización de ambos tipos de tumores. Los tumores inducidos químicamente presentan una menor cantidad de nanopartículas que los tumores Pan02 cuando el tratamiento se administra sin aplicación de un campo magnético, lo que sugiere que la permeabilidad en los fibrosarcomas inducidos químicamente podría ser menor. Por el contrario, al aplicar un campo magnético sobre la zona la cantidad de nanopartículas es mucho mayor en los tumores inducidos que en los tumores generados por inyección de células Pan02, lo que sugiere que una vez que las partículas alcanzan el tejido tumoral gracias a la acción del campo magnético quedan retenidas en los tumores inducidos químicamente en un grado mayor que en los tumores de tipo Pan02. En ambos casos la acumulación de nanopartículas en el tumor se ha visto acompañada de un aumento en los niveles de IFN- γ , lo que indica que el sistema es eficaz a la hora de distribuir la droga a la zona de interés.



El aumento en los niveles de IFN- γ en el tumor debe traducirse en una disminución del crecimiento tumoral para poder considerar el tratamiento eficaz. Tanto en los tumores generados a partir de la inyección de células de la línea Pan02, como en los generados por inducción química, la administración del tratamiento y la aplicación del campo magnético condujo a un menor tamaño tumoral tras el periodo de administración. En el caso de los tumores inducidos el tamaño tumoral se mantuvo estable durante todo el tratamiento, mientras que en los tumores Pan02 se observó una regresión del tamaño tumoral, llegándose a obtener una remisión completa en dos casos. En ambos modelos el resto de tratamientos no produjeron efectos tan evidentes, si bien en el caso de los tumores Pan02 la administración del tratamiento sin aplicación de un campo magnético condujo a una disminución significativa del tamaño tumoral, que no se observó en los animales tratados con IFN- γ soluble. Estos datos concuerdan con otros reportados con anterioridad por distintos grupos, en los que se observó que la unión de fármacos a nanopartículas mejoró su actividad y la capacidad antitumoral del fármaco en comparación con las mismas dosis de fármaco soluble (Renoir et al., 2006; Li, 2009; Cao et al., 2010; Kim et al, 2010; Dilnawaz et al., 2010).

Los efectos del IFN- γ observados sobre la región tumoral en los dos modelos utilizados en este trabajo son distintos, lo que podría explicar los diferentes resultados en cuanto a variación del tamaño tumoral tras el tratamiento.

La acumulación de IFN- γ en la región tumoral al aplicarse un campo magnético externo conlleva la activación del sistema inmune en la zona y produce un aumento en la infiltración de células T y macrófagos en ambos tipos de tumores analizados, y de células NK en el caso de los tumores Pan02. La infiltración de células T es especialmente elevada en los tumores inducidos químicamente. Estos resultados se deben probablemente a que los tumores inducidos pueden ser más inmunogénicos que las células Pan02, que presentan una baja inmunogenicidad (Clark et al., 2009). Aunque no se ha comprobado si la presencia de células CD3⁺ se corresponde con un aumento en la cantidad de células T efectoras con funciones antitumorales o a una mayor infiltración de células T reguladoras, los altos niveles de IFN- γ presentes en el ambiente tumoral y los efectos del tratamiento sobre el tamaño de los tumores sugieren que se trata de células T efectoras, cuya actividad se traduce en el control del desarrollo tumoral. En los tumores Pan02 se encontraron también diferencias en la infiltración de macrófagos y células NK en los grupos tratados con IFN- γ soluble o IFN- γ -DMSA-NP sin aplicación de campo magnético y el grupo control, siendo las diferencias mayores cuando el IFN- γ se encuentra adsorbido a las nanopartículas magnéticas, lo que se tradujo en diferencias en el tamaño tumoral tras el periodo de tratamiento. Por el contrario, en los tumores inducidos no se observaron diferencias en la infiltración de células inmunes entre el grupo control y el tratado con IFN- γ -DMSA-NP sólo.



La activación de la respuesta inmune antitumoral puede tener como resultado la protección frente al tipo de tumor que se padece no sólo a nivel local sobre el tumor primarios, sino también a distancia sobre posibles metástasis. Se ha establecido que las células inmunes activadas localmente por el IFN- γ podrían viajar a otras regiones por el torrente sanguíneo, proporcionando los mismos efectos defensivos que en el tumor primario sin necesidad de que el fármaco antitumoral llegue a esas regiones (Younes y Amsden, 2002). Esto supondría una clara ventaja frente a otros tratamientos basados en la acción directa de la droga sobre las células que forman el tumor.

El efecto antiangiogénico del IFN- γ se ha analizado en los dos modelos utilizados. En los tumores generados por inyección subcutánea de células Pan02, la administración del tratamiento con IFN- γ -DMSA-NP y la aplicación de un campo magnético condujo a una reducción significativa del grado de vascularización del tejido tumoral, disminuyendo tanto el número de vasos como el tamaño de los mismos respecto al resto de tratamientos. La administración de IFN- γ -DMSA-NP sin aplicación de un campo magnético externo produjo una disminución en el tamaño de los vasos, pero no en el número de los mismos respecto al tratamiento con IFN- γ soluble, y de la misma manera, se obtuvo una disminución del tamaño de los vasos en los tumores procedentes de ratones tratados con IFN- γ soluble respecto a los controles tratados con PBS o DMSA-NP, pero no se observaron diferencias en el número de vasos. Esto sugiere que el IFN- γ a dosis altas es capaz de impedir la formación de nuevos vasos, mientras que a dosis más bajas sólo dificulta el crecimiento de los mismos. En los tumores inducidos químicamente la administración de IFN- γ -DMSA-NP con o sin aplicación de campo magnético produjo una disminución significativa en el número de vasos y el tamaño de los mismos respecto a los controles tratados con PBS, pero no se observaron diferencias entre los dos grupos tratados con IFN- γ -DMSA-NP entre sí, lo que sugiere una menor sensibilidad al IFN- γ de los tumores inducidos por inyección subcutánea de 3-MCA. El hecho de que existan diferencias significativas en el grado de vascularización entre el grupo control y el tratado con IFN- γ -DMSA-NP sin aplicación de campo magnético, y que estas diferencias no se traduzcan en una variación en el volumen tumoral parece indicar que el efecto antiangiogénico del IFN- γ no es esencial en el control del desarrollo de este tipo de tumores.

El efecto proapoptótico del IFN- γ sobre las células tumorales resultó ser de poca importancia en ambos tipos de tumores. Sólo los tratamientos con IFN- γ -DMSA-NP y aplicación de un campo magnético produjeron la inducción de este efecto. De nuevo los tumores Pan02 resultaron más sensibles a este efecto del IFN- γ , presentando un porcentaje mayor de células apoptóticas al someterse al tratamiento respecto a los tumores inducidos químicamente, aunque en cualquier caso se observó en una pequeña proporción de células, lo que indica que este proceso no es



especialmente importante en la regresión tumoral producida por la acumulación de IFN- γ en la zona.

Todos estos resultados permiten establecer un modelo de cómo afecta el tratamiento a ambos tipos de tumores:

En el caso de los **tumores generados por inyección de células tumorales singénicas** la administración del tratamiento y la aplicación de un campo magnético externo conduce a una acumulación de nanopartículas magnéticas en el tejido tumoral y un incremento concomitante en los niveles de IFN- γ . Una vez en la región de interés el IFN- γ induce la activación de la respuesta inmune antitumoral, aumentando la infiltración de células efectoras tanto del sistema inmune innato como del adquirido. El IFN- γ induce además un efecto antiangiogénico que disminuye el grado de vascularización del tumor, dificultando la llegada de nutrientes a las células tumorales. La inducción del proceso apoptótico en las células tumorales no es especialmente importante en el proceso, aunque se observa un aumento en la proporción de células apoptóticas tras el tratamiento. Todos estos efectos conducen a una disminución en el tamaño tumoral, pudiendo llegar a eliminarse completamente.

En los **tumores inducidos químicamente mediante inyección subcutánea de 3-MCA**, la administración de IFN- γ -DMSA-NP y la aplicación de un campo magnético sobre la zona de interés también conduce a un aumento en la acumulación de nanopartículas y en los niveles de IFN- γ en el tumor. En este caso el IFN- γ va a inducir la infiltración de macrófagos y células T especialmente. La aplicación del tratamiento produce una disminución en el grado de vascularización del tumor, aunque no tan importante como la obtenida en tumores Pan02. El efecto antiangiogénico no parece ser esencial para el control del desarrollo tumoral, al igual que la inducción del proceso proapoptótico en las células tumorales, que se observa a muy bajos niveles en este tipo de tumores. Estos efectos conducen a la entrada en un proceso de equilibrio, inducido fundamentalmente por la infiltración de células inmunes, en el que el tumor no disminuye ni aumenta de tamaño, sino que se mantiene estable. Si bien el tratamiento en este caso no conduce a la eliminación del tumor, sí impide el desarrollo normal del mismo, lo que se traduciría en un mejor pronóstico.

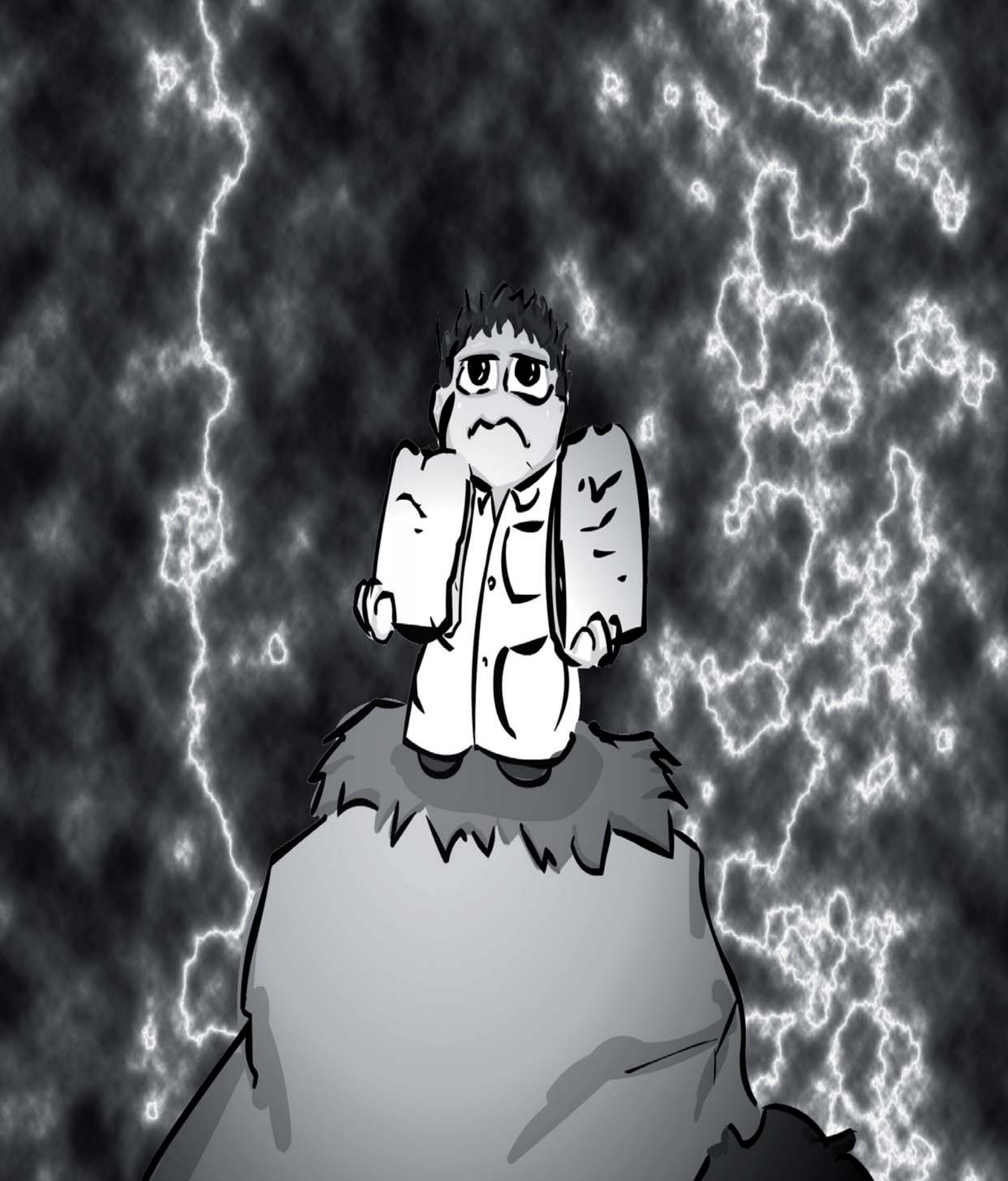
La utilización de campos magnéticos para atraer al sitio de acción dispositivos magnéticos para la liberación localizada de drogas podría servir no sólo para nanopartículas magnéticas, sino también para otros tipos de transportadores, como nanoliposomas magnéticos, que pueden contener distintos tipos de agentes terapéuticos, y que permiten la entrada en la célula de los mismos (Soenen et al., 2009), gracias a que su naturaleza lipídica favorece la fusión con la membrana plasmática de las células, y son de especial interés en terapia génica o en el caso de



fármacos que deban ejercer su función sobre componentes intracelulares. Las nanopartículas magnéticas permiten además combinar distintos tipos de terapias. La distribución de fármacos antitumorales puede unir sus efectos a la termoterapia, basada en la atracción de las nanopartículas magnéticas a la zona de interés y la posterior aplicación de un campo magnético alterno a alta frecuencia (revisado en [Krishnan, 2010](#)). Este tipo de campo hace que los momentos magnéticos de las nanopartículas se orienten en el mismo sentido que el campo aplicado, y este rápido movimiento produce un aumento de temperatura. Las células del tejido tumoral son más sensibles a las altas temperaturas que las células de tejidos normales ([Hildebrandt y Wust, 2007](#)), por lo que este tipo de terapia afecta específicamente a los tumores, y puede mejorar la respuesta inmune antitumoral ([Skitzki et al., 2009](#)). La combinación de tratamientos radio y quimioterapéuticos con la termoterapia mejora en gran medida la eficacia de estos tratamientos ([Visaria et al., 2006](#); [Purushotham et al., 2009](#); [Maier-Hauff et al., 2010](#)). Los sistemas basados en nanopartículas magnéticas abren múltiples posibilidades a la hora de aplicar tratamientos para distintos tipos de enfermedades neoplásicas, lo que permitiría diseñar terapias específicas para cada tumor.

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado.

Albert Szent Gyorgi



Conclusiones



1. Es posible adsorber mediante interacción electrostática el IFN- γ a la superficie de nanopartículas magnéticas de magnetita, que presenten una carga superficial negativa. Esta interacción se ve afectada por factores propios de las nanopartículas, como su composición y la naturaleza de su cubierta, y por factores del medio en el que se encuentran, como el pH y la fuerza iónica del medio. La mayor eficiencia en la interacción se obtuvo al utilizar nanopartículas magnéticas sintetizadas mediante descomposición en medio orgánico y cubiertas de ácido dimercaptosuccínico.
2. La interacción electrostática del IFN- γ con las nanopartículas magnéticas no afecta a la funcionalidad del IFN- γ .
3. La presencia en el medio de cultivo de nanopartículas magnéticas cubiertas de ácido dimercaptosuccínico, o su internalización en células Pan02, no produce efectos tóxicos directos ni indirectos sobre estas células. La adsorción de IFN- γ a las nanopartículas magnéticas disminuye la captación de las mismas por parte de las células Pan02.
4. La administración por vía intravenosa o subcutánea en ratones C57BL/6 de las nanopartículas utilizadas no produce signos clínicos, síntomas de malestar animal, ni alteraciones orgánicas visibles.
5. La biodistribución de estas nanopartículas en ratones C57BL/6 muestra una acumulación preferencial de las mismas en pulmón (5,27%), hígado (1,24%) y bazo (0,09%). La adsorción de IFN- γ a las partículas modifica su biodistribución, disminuyendo la acumulación en el tejido pulmonar (3,22%) y aumentando el hígado (5,19%) y bazo (0,55%). La cantidad de nanopartículas en sangre aumenta al unir IFN- γ a su superficie (1,30%) respecto a las nanopartículas cubiertas de DMSA sin adsorción de IFN- γ (0,32%).



CONCLUSIONES

5. La aplicación de un campo magnético externo varía la biodistribución de las nanopartículas magnéticas cubiertas de DMSA y unidas a IFN- γ , que tienden a acumularse en regiones cercanas al área sometida al campo magnético y disminuyen su presencia en sangre (0,53%), pulmones (2,81%), hígado (4,30%) y bazo (0,28%).

6. El sistema de distribución localizada de IFN- γ analizado transporta eficientemente la citoquina hasta el área de interés gracias a la utilización de un campo magnético externo.

7. El aumento en los niveles de citoquina en el área tumoral induce la activación local del sistema inmune induciendo una respuesta antitumoral eficaz y ejerce un efecto antiangiogénico en la zona, que se traduce en el control del desarrollo tumoral. Los tumores generados por inyección subcutánea de células Pan02 son más sensibles al tratamiento con IFN- γ , lo que conduce a una reducción en el tamaño tumoral o incluso a la remisión completa del tumor. En los tumores inducidos químicamente el tratamiento con IFN- γ induce un estado de equilibrio gracias a la activación del sistema inmune.

Uno no es lo que es por lo que escribe, sino por lo que ha leído.

Jorge Luis Borges



Bibliografía



Abdel-Wahab, Z., Weltz, C., Hester, D., Pickett, N., Vervaert, C., Barber, J. R., Jolly, D., and Seigler, H. F. (1997). A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gamma gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer* 80, 401-412.

Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R. J., Parak, F. G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., and Lubbe, A. S. (2000). Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* 60, 6641-6648.

Alexiou, C., Jurgons, R., Schmid, R. J., Bergemann, C., Henke, J., Erhardt, W., Huenges, E., and Parak, F. (2003). Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J Drug Target* 11, 139-149.

Alexiou, C., Jurgons, R., Seliger, C., Brunke, O., Iro, H., and Odenbach, S. (2007). Delivery of superparamagnetic nanoparticles for local chemotherapy after intraarterial infusion and magnetic drug targeting. *Anticancer Res* 27, 2019-2022.

Alexiou, C., Schmid, R. J., Jurgons, R., Kremer, M., Wanner, G., Bergemann, C., Huenges, E., Nawroth, T., Arnold, W., and Parak, F. G. (2006). Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur Biophys J* 35, 446-450.

Alexiou, C., Schmidt, A., Klein, R. J., Hulin, P., Bergemann, C., and Arnold, W. (2002). Magnetic drug targeting: biodistribution and dependency on magnetic field strength. *J Magn Magn Mat* 252, 363-366.

Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., and Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 5, 505-515.

Altman, S. A., Randers, L., and Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* 9, 671-674.

Angiolillo, A. L., Sgadari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Maheshwari, S., Kleinman, H. K., Reaman, G. H., and Tosato, G. (1995). Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182, 155-162.

Arias, J. L., Ruiz, M. A., Gallardo, V., and Delgado, A. V. (2008). Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J Control Release* 125, 50-58.



Arora, A., Su, G., Mathiowitz, E., Reineke, J., Chang, A. E., and Sabel, M. S. (2006). Neoadjuvant intratumoral cytokine-loaded microspheres are superior to postoperative autologous cellular vaccines in generating systemic anti-tumor immunity. *J Surg Oncol* 94, 403-412.

Arruebo, M., Fernandez Pacheco, F., Ibarra Garcia, M. R., and Santamaria, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday* 2, 22-32.

Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M., and Rosenberg, S. A. (2000). High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 6 Suppl 1, S11-14.

Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-LeFranc, J. L., Botta, A., *et al.* (2006). In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxicity study. *Environ Sci Technol* 40, 4367-4373.

Aviles, M. O., Mangual, J. O., Ebner, A. D., and Ritter, J. A. (2008). Isolated swine heart ventricle perfusion model for implant assisted-magnetic drug targeting. *Int J Pharm* 361, 202-208.

Bach, E. A., Aguet, M., and Schreiber, R. D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 563-591.

Bancroft, G. J., Schreiber, R. D., Bosma, G. C., Bosma, M. J., and Unanue, E. R. (1987). A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon-gamma. *J Immunol* 139, 1104-1107.

Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A., and Davis, M. E. (2007). Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15549-15554.

Beckhove, P., Feuerer, M., Dolenc, M., Schuetz, F., Choi, C., Sommerfeldt, N., Schwendemann, J., Ehlert, K., Altevogt, P., Bastert, G., *et al.* (2004). Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest* 114, 67-76.

Belardelli, F., Ferrantini, M., Proietti, E., and Kirkwood, J. M. (2002). Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 119-134.

Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68, 1-8.



- Benavides, F., and Guenet, J. (2000). Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina* 61, 215-231.
- Bickels, J., Kollender, Y., Merinsky, O., and Meller, I. (2002). Coley's toxin: historical perspective. *Isr Med Assoc J* 4, 471-472.
- Biron, C. A., Sonnenfeld, G., and Welsh, R. M. (1984). Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo. *J Leukoc Biol* 35, 31-37.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Boggio, K., Nicoletti, G., Di Carlo, E., Cavallo, F., Landuzzi, L., Melani, C., Giovarelli, M., Rossi, I., Nanni, P., De Giovanni, C., *et al.* (1998). Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 188, 589-596.
- Borenfreund, E., and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24, 119-124.
- Brigger, I., Dubernet, C., and Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 631-651.
- Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F., and Gately, M. K. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 178, 1223-1230.
- Buard, A., Vivo, C., Monnet, I., Boutin, C., Pilatte, Y., and Jaurand, M. C. (1998). Human malignant mesothelioma cell growth: activation of janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 1alpha for inhibition by interferon-gamma. *Cancer Res* 58, 840-847.
- Bulte, J. W., and Kraitchman, D. L. (2004). Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 567-584.
- Cai, C., Bakowsky, U., Rytting, E., Schaper, A. K., and Kissel, T. (2008). Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein. *Eur J Pharm Biopharm* 69, 31-42.
- Cao, Y., Gu, Y., Ma, H., Bai, J., Liu, L., Zhao, P., and He, H. (2010). Self-assembled nanoparticle drug delivery systems from galactosylated polysaccharide-doxorubicin conjugate loaded doxorubicin. *Int J Biol Macromol* 46, 245-249.



Cespedes, M. V., Casanova, I., Parreno, M., and Mangués, R. (2006). Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 8, 318-329.

Chada, S., Ramesh, R., and Mhashilkar, A. M. (2003). Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer. *Curr Opin Mol Ther* 5, 463-474.

Chaput, N., Conforti, R., Viaud, S., Spatz, A., and Zitvogel, L. (2008). The Janus face of dendritic cells in cancer. *Oncogene* 27, 5920-5931.

Chaves, S., Lacava, L., Lacava, Z., Silva, O., Pelegrini, F., Buske, N., Gansau, C., Morais, P., and Azevedo, R. (2002). Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *IEEE Trans Magn* 38, 3231-3233.

Chawla-Sarkar, M., Lindner, D. J., Liu, Y. F., Williams, B. R., Sen, G. C., Silverman, R. H., and Borden, E. C. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8, 237-249.

Chen, B., He, L., Savell, V. H., Jenkins, J. J., and Parham, D. M. (2000). Inhibition of the interferon-gamma/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region. *Cancer Res* 60, 3290-3298.

Chen, F. H., Zhang, L. M., Chen, Q. T., Zhang, Y., and Zhang, Z. J. (2010). Synthesis of a novel magnetic drug delivery system composed of doxorubicin-conjugated Fe(3)O(4) nanoparticle cores and a PEG-functionalized porous silica shell. *Chem Commun (Camb)* 46, 8633-8635.

Chen, L. K., Mathieu-Mahul, D., Bach, F. H., Dausset, J., Bensussan, A., and Sasportes, M. (1986). Recombinant interferon alpha can induce rearrangement of T-cell antigen receptor alpha-chain genes and maturation to cytotoxicity in T-lymphocyte clones in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4887-4889.

Chertok, B., David, A. E., and Yang, V. C. (2010). Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. *Biomaterials* 31, 6317-6324.

Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., Iwamoto, Y., and Fu, X. Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.



Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J. J., and Jallet, P. (1996). Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul* 13, 245-255.

Clark, C. E., Beatty, G. L., and Vonderheide, R. H. (2009). Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: insights from genetically engineered mouse models of cancer. *Cancer Lett* 279, 1-7.

Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., *et al.* (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187, 2009-2021.

Colombo, M. P., and Trinchieri, G. (2002). Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 155-168.

Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.

Dantal, J., and Souillou, J. P. (2005). Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 352, 1371-1373.

Davidson, W. F., Giese, T., and Fredrickson, T. N. (1998). Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 187, 1825-1838.

de Freitas, E. R., Soares, P. R., Santos Rde, P., dos Santos, R. L., da Silva, J. R., Porfirio, E. P., Bao, S. N., Lima, E. C., Morais, P. C., and Guillo, L. A. (2008). In vitro biological activities of anionic gamma-Fe₂O₃ nanoparticles on human melanoma cells. *J Nanosci Nanotechnol* 8, 2385-2391.

Decuzzi, P., and Ferrari, M. (2007). The role of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Biomaterials* 28, 2915-2922.

Detjen, K. M., Farwig, K., Welzel, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2001). Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut* 49, 251-262.



Dhawan, A., and Sharma, V. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Anal Bioanal Chem* 398, 589-605.

Dhodapkar, M. V., Krasovsky, J., Osman, K., and Geller, M. D. (2003). Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 198, 1753-1757.

Dias, S., Boyd, R., and Balkwill, F. (1998). IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model. *Int J Cancer* 78, 361-365.

Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447-456.

Dilnawaz, F., Singh, A., Mohanty, C., and Sahoo, S. K. (2010). Dual drug loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Biomaterials* 31, 3694-3706.

Ding, Y., Cravero, J. D., Adrian, K., and Grippo, P. Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas* 39, 283-292.

Ding, Y., Cravero, J. D., Adrian, K., and Grippo, P. (2010). Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas* 39, 283-292.

Dokun, A. O., Chu, D. T., Yang, L., Bendelac, A. S., and Yokoyama, W. M. (2001). Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. *J Immunol* 167, 5286-5293.

Dorrschuck, A., Schmidt, A., Schnurer, E., Gluckmann, M., Albrecht, C., Wolfel, C., Lennerz, V., Lifke, A., Di Natale, C., Ranieri, E., *et al.* (2004). CD8+ cytotoxic T lymphocytes isolated from allogeneic healthy donors recognize HLA class Ia/Ib-associated renal carcinoma antigens with ubiquitous or restricted tissue expression. *Blood* 104, 2591-2599.

Dranoff, G. (2002). GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev* 188, 147-154.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3539-3543.

Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., and Papahadjopoulos, D. (1999).



Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 51, 691-743.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Sheehan, K. C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J. D., Diamond, M. S., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., and Schreiber, R. D. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 6, 722-729.

Dunn, G. P., Koebel, C. M., and Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6, 836-848.

Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.

Dvorak, H. F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20, 4368-4380.

Fatourou, E. M., and Koskinas, J. S. (2009). Adaptive immunity in hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 1499-1510.

Feldman, E. D., Weinreich, D. M., Carroll, N. M., Burness, M. L., Feldman, A. L., Turner, E., Xu, H., and Alexander, H. R., Jr. (2006). Interferon gamma-inducible protein 10 selectively inhibits proliferation and induces apoptosis in endothelial cells. *Ann Surg Oncol* 13, 125-133.

Fellous, M., Nir, U., Wallach, D., Merlin, G., Rubinstein, M., and Revel, M. (1982). Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3082-3086.

Fernandez Pacheco, F., Marquina, C., Valdivia, J., Gutiérrez, M., Romero, M., Cornudella, R., Laborda, A., Vilorio, A., Higuera, T., García, A., *et al.* (2007). Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. *J Magn Magn Mat* 311.

Fernandez-Pacheco, R., Valdivia, J. G., and Ibarra, M. R. (2009). Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. *Methods Mol Biol* 544, 559-569.

Fidler, I. J. (2000). Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J* 6 Suppl 2, S134-141.

Fiorito, S., Serafino, A., Andreola, F., Togna, A., and Togna, G. (2006). Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 6, 591-599.



Fisher, R. I., Rosenberg, S. A., and Fyfe, G. (2000). Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am* 6 *Suppl* 1, S55-57.

Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M. L., Stenling, R., Jung, A., and Palmqvist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 13, 1472-1479.

Fountoulakis, M., Juranville, J. F., Stuber, D., Weibel, E. K., and Garotta, G. (1990). Purification and biochemical characterization of a soluble human interferon gamma receptor expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265, 13268-13275.

Fukumori, Y., Ichikawa, H. (2006). Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Adv Powder Technology* 17, 1

Gaihre, B., Khil, M. S., Lee, D. R., and Kim, H. Y. (2009). Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study. *Int J Pharm* 365, 180-189.

Gao, X., Yang, L., Petros, J. A., Marshall, F. F., Simons, J. W., and Nie, S. (2005). In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr Opin Biotechnol* 16, 63-72.

Gao, Y., Li, Z., Sun, M., Guo, C., Yu, A., Xi, Y., Cui, J., Lou, H., and Zhai, G. (2010). Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension. *Drug Deliv*.

Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L. H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* 198, 433-442.

García, M., Miranda Parca, M., Chaves, S., Silva, L., Santos, A., Marques Lacava, Z., Morais, P., and Azevedo, R. (2005). Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetic-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *J Magn Magn Mat* 293, 277-282.

Gatti, R. A., and Good, R. A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28, 89-98.

Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol* 126, 25-31.



Girardi, M., Glusac, E., Filler, R. B., Roberts, S. J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2003). The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med* 198, 747-755.

Gresser, I., and Belardelli, F. (2002). Endogenous type I interferons as a defense against tumors. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 111-118.

Gresser, I., Belardelli, F., Maury, C., Maunoury, M. T., and Tovey, M. G. (1983). Injection of mice with antibody to interferon enhances the growth of transplantable murine tumors. *J Exp Med* 158, 2095-2107.

Gresser, I., Maury, C., Vignaux, F., Haller, O., Belardelli, F., and Tovey, M. G. (1988). Antibody to mouse interferon alpha/beta abrogates resistance to the multiplication of Friend erythroleukemia cells in the livers of allogeneic mice. *J Exp Med* 168, 1271-1291.

Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.

Gutierrez, L., Lazaro, F. J., Abadia, A. R., Romero, M. S., Quintana, C., Puerto Morales, M., Patino, C., and Arranz, R. (2006). Bioinorganic transformations of liver iron deposits observed by tissue magnetic characterisation in a rat model. *J Inorg Biochem* 100, 1790-1799.

Hanahan, D., Christofori, G., Naik, P., and Arbeit, J. (1996). Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 32A, 2386-2393.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G., and Smyth, M. J. (2003). Alpha-galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9464-9469.

Heuser, L. S., and Miller, F. N. (1986). Differential macromolecular leakage from the vasculature of tumors. *Cancer* 57, 461-464.

Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., and Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20, 1218-1249.



- Hildebrandt, B., and Wust, P. (2007). Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Res* 134, 185-193.
- Hillaireau, H., and Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 66, 2873-2896.
- Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., and Jain, R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4607-4612.
- Homma, S., Sagawa, Y., Komita, H., Koido, S., Nagasaki, E., Ryoma, Y., and Okamoto, M. (2007). Mechanism of antitumor effect on mouse hepatocellular carcinoma by intratumoral injection of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Immunol Immunother* 56, 1265-1274.
- Hou, J., Baichwal, V., and Cao, Z. (1994). Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11641-11645.
- Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 95-109.
- Jain, R. K. (1989). Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst* 81, 570-576.
- Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L., and Labhasetwar, V. (2008). Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm* 5, 316-327.
- Jaiswal, S., Chao, M. P., Majeti, R., and Weissman, I. L. (2010). Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends Immunol* 31, 212-219.
- Jang, S. H., Wientjes, M. G., Lu, D., and Au, J. L. (2003). Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res* 20, 1337-1350.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.
- Jesse, T. L., LaChance, R., Iademarco, M. F., and Dean, D. C. (1998). Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where It regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* 140, 1265-1276.



Jett, J. R., Maksymiuk, A. W., Su, J. Q., Mailliard, J. A., Krook, J. E., Tschetter, L. K., Kardinal, C. G., Twito, D. I., Levitt, R., and Gerstner, J. B. (1994). Phase III trial of recombinant interferon gamma in complete responders with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 12, 2321-2326.

Kaiga, T., Sato, M., Kaneda, H., Iwakura, Y., Takayama, T., and Tahara, H. (2007). Systemic administration of IL-23 induces potent antitumor immunity primarily mediated through Th1-type response in association with the endogenously expressed IL-12. *J Immunol* 178, 7571-7580.

Kang, W. K., Park, C., Yoon, H. L., Kim, W. S., Yoon, S. S., Lee, M. H., Park, K., Kim, K., Jeong, H. S., Kim, J. A., *et al.* (2001). Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 12, 671-684.

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-7561.

Kaplan, G., Luster, A. D., Hancock, G., and Cohn, Z. A. (1987). The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* 166, 1098-1108.

Khong, H. T., and Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005.

Kim, C. K., and Lim, S. J. (2002). Recent progress in drug delivery systems for anticancer agents. *Arch Pharm Res* 25, 229-239.

Kim, S., Iizuka, K., Kang, H. S., Dokun, A., French, A. R., Greco, S., and Yokoyama, W. M. (2002). In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 3, 523-528.

Kim, T. H., Jiang, H. H., Youn, Y. S., Park, C. W., Tak, K. K., Lee, S., Kim, H., Jon, S., Chen, X., and Lee, K. C. (2010). Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *Int J Pharm*.

Kingsley, J. D., Dou, H., Morehead, J., Rabinow, B., Gendelman, H. E., and Destache, C. J. (2006). Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 340-350.



Kircheis, R., Ostermann, E., Wolschek, M. F., Lichtenberger, C., Magin-Lachmann, C., Wightman, L., Kursa, M., and Wagner, E. (2002). Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor-alpha induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity. *Cancer Gene Ther* 9, 673-680.

Kirpotin, D. B., Drummond, D. C., Shao, Y., Shalaby, M. R., Hong, K., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Benz, C. C., and Park, J. W. (2006). Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res* 66, 6732-6740.

Kommareddy, S., and Amiji, M. (2007). Biodistribution and pharmacokinetic analysis of long-circulating thiolated gelatin nanoparticles following systemic administration in breast cancer-bearing mice. *J Pharm Sci* 96, 397-407.

Krishnan, K. (2010). Biomedical nanomagnetism: a spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Trans Magn* 46, 2523-2558.

Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., and Schnekenburger, J. (2009). Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 72, 370-377.

Kubin, M., Chow, J. M., and Trinchieri, G. (1994). Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 83, 1847-1855.

Kunath, K., von Harpe, A., Petersen, H., Fischer, D., Voigt, K., Kissel, T., and Bickel, U. (2002). The structure of PEG-modified poly(ethylene imines) influences biodistribution and pharmacokinetics of their complexes with NF-kappaB decoy in mice. *Pharm Res* 19, 810-817.

Kurooka, M., and Kaneda, Y. (2007). Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells. *Cancer Res* 67, 227-236.

Lah, T. T., Hawley, M., Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1995). Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett* 363, 85-89.

Lanier, L. L. (2005). NKG2D in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560, 51-56.

Leffers, N., Gooden, M. J., de Jong, R. A., Hooijboom, B. N., ten Hoor, K. A., Hollema, H., Boezen, H. M., van der Zee, A. G., Daemen, T., and Nijman, H. W. (2009). Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 58, 449-459.



- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., and Ryan, J. L. (1997). Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90, 2541-2548.
- Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4, 26-49.
- Li, C. Y., Huang, Q., and Kung, H. F. (2005). Cytokine and immuno-gene therapy for solid tumors. *Cell Mol Immunol* 2, 81-91.
- Li, W. T. (2009). Nanotechnology-based strategies to enhance the efficacy of photodynamic therapy for cancers. *Curr Drug Metab* 10, 851-860.
- Liao, F., Rabin, R. L., Yannelli, J. R., Koniaris, L. G., Vanguri, P., and Farber, J. M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 182, 1301-1314.
- Lipski, A. M., Pino, C. J., Haselton, F. R., Chen, I. W., and Shastri, V. P. (2008). The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function. *Biomaterials* 29, 3836-3846.
- Liu, L., Sakaguchi, T., Kanda, T., Hitomi, J., Tabata, Y., and Hatakeyama, K. (2003). Delivery of interleukin-12 in gelatin hydrogels effectively suppresses development of transplanted colonal carcinoma in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 51, 53-57.
- Liu, V. C., Wong, L. Y., Jang, T., Shah, A. H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B. A., and Lee, C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 178, 2883-2892.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R., and Anderson, J. P. (2003). Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 776-781.
- Lopez, A., Gutierrez, L., and Lazaro, F. J. (2007). The role of dipolar interaction in the quantitative determination of particulate magnetic carriers in biological tissues. *Phys Med Biol* 52, 5043-5056.



Lotze, M. T., Rubin, J. T., Carty, S., Edington, H., Ferson, P., Landreneau, R., Pippin, B., Posner, M., Rosenfelder, D., Watson, C., and et al. (1994). Gene therapy of cancer: a pilot study of IL-4-gene-modified fibroblasts admixed with autologous tumor to elicit an immune response. *Hum Gene Ther* 5, 41-55.

Lu, Y., Yang, W., Qin, C., Zhang, L., Deng, J., Liu, S., and Qin, Z. (2009). Responsiveness of stromal fibroblasts to IFN-gamma blocks tumor growth via angiostasis. *J Immunol* 183, 6413-6421.

Lubbe, A. S., Bergemann, C., Huhnt, W., Fricke, T., Riess, H., Brock, J. W., and Huhn, D. (1996a). Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. *Cancer Res* 56, 4694-4701.

Lubbe, A. S., Bergemann, C., Riess, H., Schriever, F., Reichardt, P., Possinger, K., Matthias, M., Dorken, B., Herrmann, F., Gurtler, R., et al. (1996b). Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res* 56, 4686-4693.

Lyer, S., Tietze, R., Jurgons, R., Struffert, T., Engelhorn, T., Schreiber, E., Dorfler, A., and Alexiou, C. (2010). Visualisation of tumour regression after local chemotherapy with magnetic nanoparticles - a pilot study. *Anticancer Res* 30, 1553-1557.

Ma, H. L., Whitters, M. J., Konz, R. F., Senices, M., Young, D. A., Grusby, M. J., Collins, M., and Dunussi-Joannopoulos, K. (2003). IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma. *J Immunol* 171, 608-615.

Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., and Reith, W. (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14, 301-331.

Maeda, H., Bharate, G. Y., and Daruwalla, J. (2009). Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm* 71, 409-419.

Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65, 271-284.

Maeng, J. H., Lee, D. H., Jung, K. H., Bae, Y. H., Park, I. S., Jeong, S., Jeon, Y. S., Shim, C. K., Kim, W., Kim, J., et al. (2010). Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer. *Biomaterials* 31, 4995-5006.



Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., and Jordan, A. (2010). Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*.

Mandal, M., Bandyopadhyay, D., Goepfert, T. M., and Kumar, R. (1998). Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene* 16, 217-225.

McHugh, R. S., and Shevach, E. M. (2002). The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 110, 693-702.

Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O. I., and Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* 150, 552-558.

Mestas, J., and Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738.

Moghimi, S. M., Hunter, A. C., and Murray, J. C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53, 283-318.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Naganuma, H., Sasaki, A., Satoh, E., Nagasaka, M., Nakano, S., Isoe, S., and Nukui, H. (1998). Down-regulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 secretion from malignant glioma cells by cytokines and anticancer drugs. *J Neurooncol* 39, 227-236.

Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R. A., Harris, J., Vely, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S., and Davis, D. M. (2007). Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 109, 3776-3785.

Nel, A. E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., and Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8, 543-557.

Neuberger, T., Schopf, B., Hofmann, H., Hofmann, N., and von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J Magn Magn Mat* 2005, 483-496.



- Newman, P. J. (1994). The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci* 714, 165-174.
- Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., *et al.* (2000). The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 12, 987-994.
- Noguchi, Y., Jungbluth, A., Richards, E. C., and Old, L. J. (1996). Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11798-11801.
- Nutt, S. L., Brady, J., Hayakawa, Y., and Smyth, M. J. (2004). Interleukin 21: a key player in lymphocyte maturation. *Crit Rev Immunol* 24, 239-250.
- O'Brien, N. M., Woods, J. A., Aherne, S. A., and O'Callaghan, Y. C. (2000). Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans* 28, 22-26.
- Okon, E., Pouliquen, D., Okon, P., Kovaleva, Z. V., Stepanova, T. P., Lavit, S. G., Kudryavtsev, B. N., and Jallet, P. (1994). Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab Invest* 71, 895-903.
- Okuhata, Y. (1999). Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging. *Adv Drug Del Rev* 37, 121-137.
- Owens, D. E., 3rd, and Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307, 93-102.
- Panagi, Z., Beletsi, A., Evangelatos, G., Livaniou, E., Ithakissios, D. S., and Avgoustakis, K. (2001). Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* 221, 143-152.
- Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C., and *et al.* (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11460-11464.
- Parr, M. J., Masin, D., Cullis, P. R., and Bally, M. B. (1997). Accumulation of liposomal lipid and encapsulated doxorubicin in murine Lewis lung carcinoma: the lack of beneficial effects by coating liposomes with poly(ethylene glycol). *J Pharmacol Exp Ther* 280, 1319-1327.



Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J., Ulman, A., and Rafailovich, M. (2006). Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* 2, 766-773.

Poggi, A., and Zocchi, M. R. (2006). Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54, 323-333.

Prchal, M., Pilz, A., Simma, O., Lingnau, K., von Gabain, A., Strobl, B., Muller, M., and Decker, T. (2009). Type I interferons as mediators of immune adjuvants for T- and B cell-dependent acquired immunity. *Vaccine* 27 Suppl 6, G17-20.

Purushotham, S., Chang, P. E., Rumpel, H., Kee, I. H., Ng, R. T., Chow, P. K., Tan, C. K., and Ramanujan, R. V. (2009). Thermoresponsive core-shell magnetic nanoparticles for combined modalities of cancer therapy. *Nanotechnology* 20, 305101.

Renoir, J. M., Stella, B., Ameller, T., Connault, E., Opolon, P., and Marsaud, V. (2006). Improved anti-tumoral capacity of mixed and pure anti-oestrogens in breast cancer cell xenografts after their administration by entrapment in colloidal nanosystems. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 114-127.

Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R., and Dringen, R. (2004). Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* 331, 370-375.

Ritter, M., Huber, C., Aubock, J., Pohl-Markl, H., Troppmair, J., Herold, M., Gachter, A., Nussbaumer, W., Bock, G., Nachbaur, D., and et al. (1994). Lytic susceptibility of target cells to cytotoxic T cells is determined by their constitutive major histocompatibility complex class I antigen expression and cytokine-induced activation status. *Immunology* 81, 569-577.

Rochlitz, C. F., Jantscheff, P., Bongartz, G., Dietrich, P. Y., Quiquerez, A. L., Schatz, C., Mehtali, M., Courtney, M., Tartour, E., Dorval, T., et al. (1998). Gene therapy with cytokine-transfected xenogeneic cells in metastatic tumors. *Adv Exp Med Biol* 451, 531-537.

Rosenberg, S. A., Mule, J. J., Spiess, P. J., Reichert, C. M., and Schwarz, S. L. (1985). Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J Exp Med* 161, 1169-1188.



Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. (1994). Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 271, 907-913.

Rosengart, A., Kaminski, M., Chen, H., Caviness, P., Ebner, A., and Ritter, J. (2005). Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: A novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery. *J Magn Magn Mat* 293, 633-638.

Roy, E. J., Gawlick, U., Orr, B. A., Rund, L. A., Webb, A. G., and Kranz, D. M. (2000). IL-12 treatment of endogenously arising murine brain tumors. *J Immunol* 165, 7293-7299.

Rubinstein, N., Ilarregui, J. M., Toscano, M. A., and Rabinovich, G. A. (2004). The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 64, 1-12.

Schmitz-Winnenthal, F. H., Volk, C., Z'Graggen, K., Galindo, L., Nummer, D., Ziouta, Y., Bucur, M., Weitz, J., Schirmacher, V., Buchler, M. W., and Beckhove, P. (2005). High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Res* 65, 10079-10087.

Schneider, H. J., Heddle, R. M., Downes, M. O., Wan, K. M., and Smedley, H. M. (1998). Intralesional interferon for the treatment of metastatic carcinoid tumours. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 10, 129-130.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.

Seagrave, J. (2008). Mechanisms and implications of air pollution particle associations with chemokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 232, 469-477.

Seliger, B., Hohne, A., Knuth, A., Bernhard, H., Meyer, T., Tampe, R., Momburg, F., and Huber, C. (1996). Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression. *Cancer Res* 56, 1756-1760.

Serraino, D., Piselli, P., Busnach, G., Burra, P., Citterio, F., Arbustini, E., Baccarani, U., De Juli, E., Pozzetto, U., Bellelli, S., *et al.* (2007). Risk of cancer following immunosuppression in organ transplant recipients and in HIV-positive individuals in southern Europe. *Eur J Cancer* 43, 2117-2123.



Sertoli, M. R., Bernengo, M. G., Ardizzoni, A., Brunetti, I., Falcone, A., Vidili, M. G., Cusimano, M. P., Appino, A., Doveil, G., Fortini, C., and et al. (1989). Phase II trial of recombinant alpha-2b interferon in the treatment of metastatic skin melanoma. *Oncology* 46, 96-98.

Seymour, L. W. (1992). Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9, 135-187.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.

Shenoy, D., Little, S., Langer, R., and Amiji, M. (2005). Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 2. In vivo distribution and tumor localization studies. *Pharm Res* 22, 2107-2114.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.

Singh, R., and Lillard, J. W., Jr. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86, 215-223.

Skitzki, J. J., Repasky, E. A., and Evans, S. S. (2009). Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 10, 550-558.

Smyth, M. J. (2005). Type I interferon and cancer immunoediting. *Nat Immunol* 6, 646-648.

Smyth, M. J., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 13, 459-463.

Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2000). NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol* 1, 459-460.

Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R., and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6.

Smyth, M. J., Taniguchi, M., and Street, S. E. (2000a). The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* 165, 2665-2670.



Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2000b). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191, 661-668.

Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., MacGregor, D., Godfrey, D. I., and Trapani, J. A. (2000c). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192, 755-760.

Soenen, S. J., and De Cuyper, M. (2009). Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging* 4, 207-219.

Soenen, S. J., Hodenius, M., and De Cuyper, M. (2009). Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 4, 177-191.

Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264.

Street, S. E., Cretney, E., and Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-197.

Street, S. E., Trapani, J. A., MacGregor, D., and Smyth, M. J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196, 129-134.

Strieter, R. M., Belperio, J. A., Burdick, M. D., and Keane, M. P. (2005). CXC chemokines in angiogenesis relevant to chronic fibroproliferation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 23-26.

Subramaniam, P. S., Torres, B. A., and Johnson, H. M. (2001). So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* 15, 175-187.

Sun, Y., Jurgovsky, K., Moller, P., Alijagic, S., Dorbic, T., Georgieva, J., Wittig, B., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 5, 481-490.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195, 161-169.



Talmadge, J. E., Singh, R. K., Fidler, I. J., and Raz, A. (2007). Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* 170, 793-804.

Tani, K., Azuma, M., Nakazaki, Y., Oyaizu, N., Hase, H., Ohata, J., Takahashi, K., OiwaMonna, M., Hanazawa, K., Wakumoto, Y., *et al.* (2004). Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: clinical and immunological findings. *Mol Ther* 10, 799-816.

Tartaj, P., Morales, M., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carreño, T., and Serna, C. (2003). The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 36, R182-R187.

Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J., and Oppenheim, J. J. (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177, 1809-1814.

Tawara, I., Take, Y., Uenaka, A., Noguchi, Y., and Nakayama, E. (2002). Sequential involvement of two distinct CD4⁺ regulatory T cells during the course of transplantable tumor growth and protection from 3-methylcholanthrene-induced tumorigenesis by CD25-depletion. *Jpn J Cancer Res* 93, 911-916.

Tay, C. H., Yu, L. Y., Kumar, V., Mason, L., Ortaldo, J. R., and Welsh, R. M. (1999). The role of LY49 NK cell subsets in the regulation of murine cytomegalovirus infections. *J Immunol* 162, 718-726.

Taylor, J. L., and Grossberg, S. E. (1998). The effects of interferon-alpha on the production and action of other cytokines. *Semin Oncol* 25, 23-29.

Terabe, M., and Berzofsky, J. A. (2008). The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 101, 277-348.

Thom, A. K., Fraker, D. L., Taubenberger, J. K., and Norton, J. A. (1992). Effective regional therapy of experimental cancer with paralesional administration of tumour necrosis factor-alpha + interferon-gamma. *Surg Oncol* 1, 291-298.

Thompson, J. A., Peace, D. J., Klarnet, J. P., Kern, D. E., Greenberg, P. D., and Cheever, M. A. (1986). Eradication of disseminated murine leukemia by treatment with high-dose interleukin 2. *J Immunol* 137, 3675-3680.



Trapani, J. A., and Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.

Trinchieri, G., Santoli, D., Granato, D., and Perussia, B. (1981). Antagonistic effects of interferons on the cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Fed Proc* 40, 2705-2710.

Ueda, R., Yoshida, K., Kawase, T., Kawakami, Y., and Toda, M. (2007). Preferential expression and frequent IgG responses of a tumor antigen, SOX5, in glioma patients. *Int J Cancer* 120, 1704-1711.

Ullrich, E., Menard, C., Flament, C., Terme, M., Mignot, G., Bonmort, M., Plumas, J., Chaperot, L., Chaput, N., and Zitvogel, L. (2008). Dendritic cells and innate defense against tumor cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 79-92.

Valois, C. R., Braz, J. M., Nunes, E. S., Vinolo, M. A., Lima, E. C., Curi, R., Kuebler, W. M., and Azevedo, R. B. (2010). The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a beta2 integrin-dependent pathway. *Biomaterials* 31, 366-374.

Valois, C. R., Nunes, E. S., Jaeger, R. G., Lima, E. C., Morais, P. C., and Azevedo, R. B. (2009). Expression patterns of cell adhesion molecules in mice's lung after administration of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid-coated maghemite nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 9, 2846-2855.

van den Broek, M. E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184, 1781-1790.

van Houdt, I. S., Sluijter, B. J., Moesbergen, L. M., Vos, W. M., de Gruijl, T. D., Molenkamp, B. G., van den Eertwegh, A. J., Hooijberg, E., van Leeuwen, P. A., Meijer, C. J., and Oudejans, J. J. (2008). Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer* 123, 609-615.

Varnavski, A. N., Calcedo, R., Bove, M., Gao, G., and Wilson, J. M. (2005). Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naïve and pre-immunized mice. *Gene Ther* 12, 427-436.

Veisheh, O., Gunn, J. W., and Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 284-304.



Vial, T., and Descotes, J. (1995). Immune-mediated side-effects of cytokines in humans. *Toxicology* 105, 31-57.

Villanueva, A., Canete, M., Roca, A. G., Calero, M., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C. J., Morales Mdel, P., and Miranda, R. (2009). The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* 20, 115103.

Visaria, R. K., Griffin, R. J., Williams, B. W., Ebbini, E. S., Paciotti, G. F., Song, C. W., and Bischof, J. C. (2006). Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor-alpha delivery. *Mol Cancer Ther* 5, 1014-1020.

Wakita, D., Chamoto, K., Ohkuri, T., Narita, Y., Ashino, S., Sumida, K., Nishikawa, H., Shiku, H., Togashi, Y., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2009). IFN-gamma-dependent type 1 immunity is crucial for immunosurveillance against squamous cell carcinoma in a novel mouse carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 30, 1408-1415.

Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27, 5932-5943.

Wang, G., Tschoi, M., Spolski, R., Lou, Y., Ozaki, K., Feng, C., Kim, G., Leonard, W. J., and Hwu, P. (2003a). In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res* 63, 9016-9022.

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., *et al.* (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10, 48-54.

Wang, Y., Hu, J. K., Krol, A., Li, Y. P., Li, C. Y., and Yuan, F. (2003b). Systemic dissemination of viral vectors during intratumoral injection. *Mol Cancer Ther* 2, 1233-1242.

Warshaw, A. L., and Fernandez-del Castillo, C. (1992). Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 326, 455-465.

Weber, J. S., and Rosenberg, S. A. (1988). Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro. *Cancer Res* 48, 5818-5824.

Wenig, B. L., Werner, J. A., Castro, D. J., Sridhar, K. S., Garewal, H. S., Kehrl, W., Pluzanska, A., Arndt, O., Costantino, P. D., Mills, G. M., *et al.* (2002). The role of intratumoral therapy with cisplatin/epinephrine injectable gel in the management of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128, 880-885.



Whitehead, R. P., Unger, J. M., Goodwin, J. W., Walker, M. J., Thompson, J. A., Flaherty, L. E., and Sondak, V. K. (1998). Phase II trial of recombinant human interleukin-4 in patients with disseminated malignant melanoma: a Southwest Oncology Group study. *J Immunother* 21, 440-446.

Whitmore, M. M., DeVeer, M. J., Edling, A., Oates, R. K., Simons, B., Lindner, D., and Williams, B. R. (2004). Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 64, 5850-5860.

Wu, T., Hua, M., Chen, J., Wei, K., Jung, S., Chang, Y., Jou, M., and Ma, Y. (2007). Effects of external magnetic field on biodistribution of nanoparticles: A histological study. *J Magn Magn Mat* 311, 372-375.

Xu, M., Mizoguchi, I., Morishima, N., Chiba, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2010). Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol* 2010.

Xu, X., Fu, X. Y., Plate, J., and Chong, A. S. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58, 2832-2837.

Yang, G., Xu, Y., Chen, X., and Hu, G. (2007). IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma. *Oncogene* 26, 594-603.

Yang, I., Tihan, T., Han, S. J., Wensch, M. R., Wiencke, J., Sughrue, M. E., and Parsa, A. T. (2010). CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J Clin Neurosci* 17, 1381-1385.

Yellen, B. B., Hovorka, O., and Friedman, G. (2005). Arranging matter by magnetic nanoparticle assemblers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8860-8864.

Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., and Yoshida, T. O. (1994). IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 857-861.

Younes, H. M., and Amsden, B. G. (2002). Interferon-gamma therapy: evaluation of routes of administration and delivery systems. *J Pharm Sci* 91, 2-17.

Yuan, F., Leunig, M., Huang, S. K., Berk, D. A., Papahadjopoulos, D., and Jain, R. K. (1994). Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res* 54, 3352-3356.



Zamanakou, M., Germenis, A. E., and Karanikas, V. (2007). Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett* 111, 69-75.

Zerafa, N., Westwood, J. A., Cretney, E., Mitchell, S., Waring, P., Iezzi, M., and Smyth, M. J. (2005). Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J Immunol* 175, 5586-5590.

Zheng, J., Wang, J., Tang, T., Li, G., Cheng, H., and Zou, S. (2006). Experimental study on magnetic drug targeting in treating cholangiocarcinoma based on internal magnetic fields. *Chin Ger J Clin Oncol* 5, P-336-P338.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6, 715-727.

Zwirner, N. W., and Domaica, C. I. (2010). Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36, 274-288.

*No entiendes realmente algo a no ser que seas capaz de explicárselo
a tu abuela.*

Albert Einstein



Anexo I

Fundamentos de magnetismo y nanopartículas magnéticas



Dado que el trabajo realizado y presentado en esta tesis es un estudio multidisciplinar en el que tienen una gran relevancia algunos campos alejados de la Biología Molecular, en este anexo se proporciona información de interés que no ha sido recogida en otras secciones, como el origen del magnetismo y los tipos de comportamiento magnético de la materia, en especial de los materiales nanométricos que presentan un comportamiento especial al ser sometidos a un campo magnético, como es el caso de las nanopartículas. También se repasan los distintos tipos de métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas y su estabilización en medio acuoso. Finalmente se detallan las propiedades que se analizan para la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.

Figura AI.1

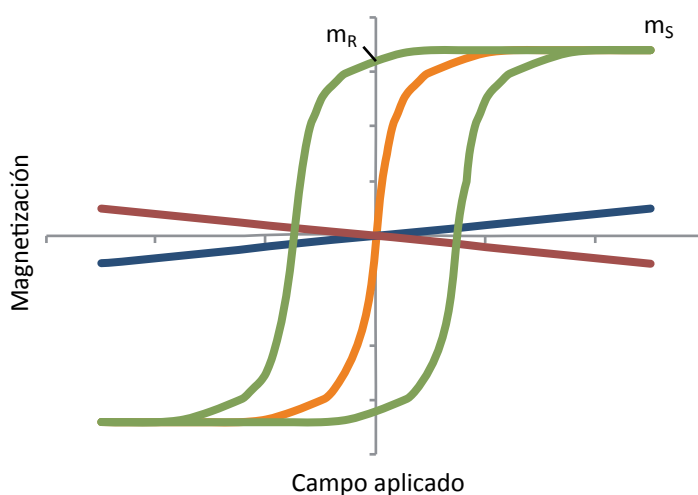


Figura AI.1. Curvas típicas de magnetización de sólidos con distintos comportamientos magnéticos. Mediante la determinación de las curvas de magnetización se obtienen los valores de la magnetización de saturación (m_s), que se corresponde con la magnetización cuando todos los momentos magnéticos se encuentran alineados con el campo magnético aplicado, y la magnetización remanente (m_R), que es el valor de magnetización residual del sólido cuando el campo aplicado se elimina. En la figura se representan las curvas típicas de un sólido diamagnético (rojo), paramagnético (azul), ferromagnético (verde) y superparamagnético (naranja).

1. Magnetismo y comportamiento magnético.

Todos los materiales son magnéticos en menor o mayor medida. La causa física del magnetismo en un material se encuentra en el orbital que ocupan los electrones alrededor del núcleo atómico, y en el momento de *spin* de los electrones. El momento magnético general de un átomo es la suma neta de todos los momentos magnéticos de los electrones individuales. En un átomo los momentos magnéticos opuestos de algunos pares de electrones se cancelan entre ellos. Así, en el caso de un átomo con orbitales electrónicos completamente llenos, el momento magnético normalmente se cancela completamente y solo los átomos con electrones desapareados tienen un momento magnético. La diferencia en la configuración de los electrones en los distintos elementos determina la naturaleza y magnitud de los momentos magnéticos atómicos, lo que



a su vez determina la diferencia entre las propiedades magnéticas de los materiales. Existen diversas formas de comportamiento magnético ante un campo magnético inducido a diferentes temperaturas (Figura AI.1), como el diamagnetismo, el paramagnetismo, el ferromagnetismo, el ferrimagnetismo, el antiferromagnetismo y el superparamagnetismo, que es un tipo de comportamiento magnético especial que aparece en algunos materiales nanométricos.

1.1 Diamagnetismo.

El diamagnetismo suele ser muy débil. Los materiales diamagnéticos no presentan electrones desapareados, lo que supone que los momentos magnéticos de los electrones se anulan de forma que los átomos no presentan un momento magnético neto. Si no están sometidos a un campo magnético, los materiales diamagnéticos tienen un momento magnético igual a cero, sin embargo al aplicarse un campo magnético se induce un momento magnético opuesto al campo aplicado (Figura AI.2), produciendo una magnetización negativa (Figura AI.1).

Figura AI.2

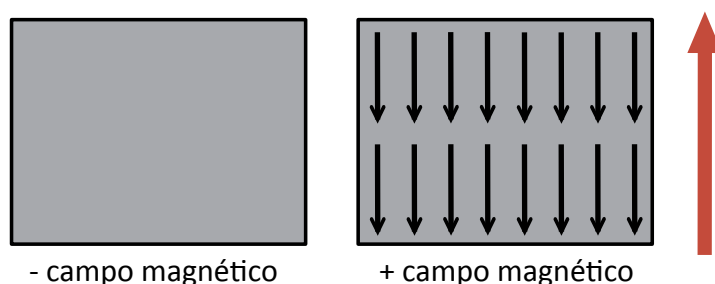


Figura AI.2. Representación esquemática de los momentos magnético de un compuesto diamagnético. Las sustancias diamagnéticas se componen de átomos que no presentan un momento magnético neto. Sin embargo, al ser sometidas a un campo magnético (rojo), los momentos magnéticos se orientan en sentido contrario al campo aplicado.

1.2 Paramagnetismo.

Los materiales paramagnéticos poseen átomos o iones con momentos magnéticos netos debido a la presencia de electrones desapareados en orbitales semioocupados. Si el material no está sometido a un campo magnético, los momentos se encuentran orientados al azar por lo que la magnetización es cero. Al aplicarse un campo magnético los momentos se orientan de forma paralela al campo aplicado y en el mismo sentido (Figura AI.3), lo que genera una magnetización positiva (Figura AI.1).

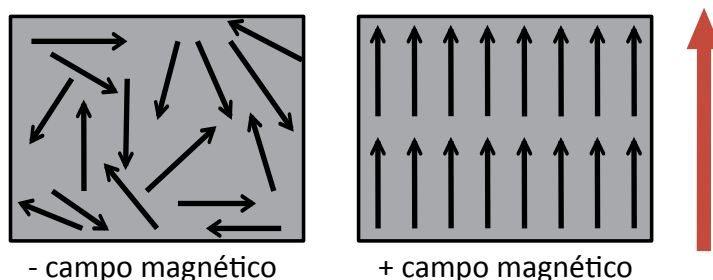
**Figura AI.3**

Figura AI.3. Representación esquemática de los momentos magnéticos de un compuesto paramagnético. Los momentos magnéticos de los átomos que componen las sustancias paramagnéticas se disponen al azar en ausencia de un campo magnético. La aplicación del campo induce la orientación de los momentos en el mismo sentido del campo aplicado.

1.3 Ferro-, ferri- y antiferromagnetismo.

Estos materiales presentan algunos átomos o iones con momentos magnéticos netos y además existen interacciones entre ellos producidas por fuerzas de intercambio electrónico. Las diferencias entre estos tipos de comportamiento magnético se basan en la distinta orientación de los momentos magnéticos.

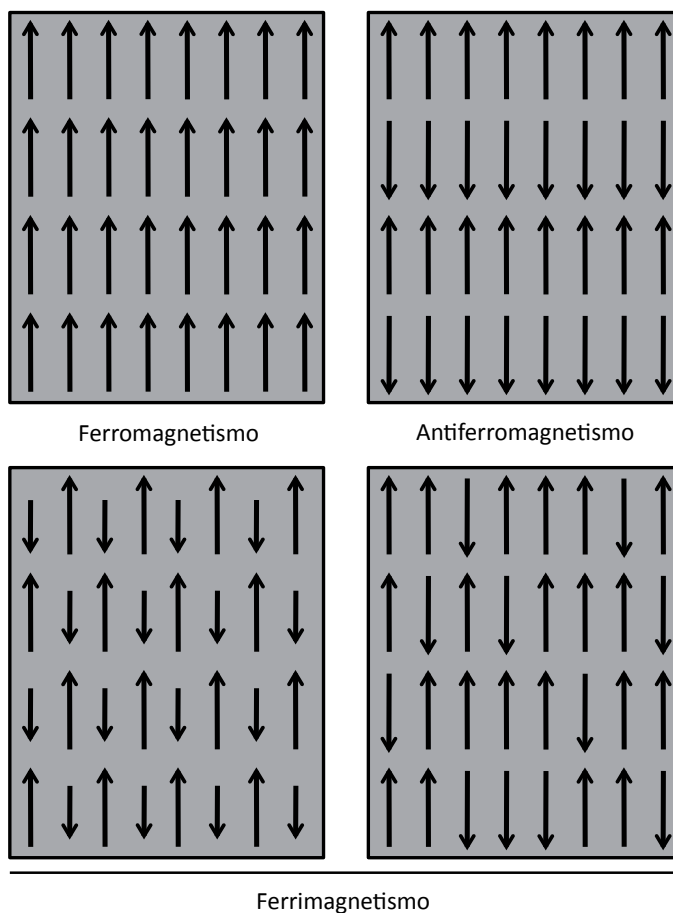
Figura AI.4

Figura AI.4. Representación esquemática de los momentos magnéticos de un compuesto ferro-, ferri- o antiferromagnético. Los materiales ferro- y ferrimagnéticos presentan un momento magnético neto aún en ausencia de campo magnético, mientras que los materiales antiferromagnéticos los momentos de sus átomos son iguales pero opuestos, por lo que carecen de momento neto.



Los materiales ferromagnéticos presentan los momentos de sus átomos alineados de forma paralela, lo que genera una alta magnetización neta, incluso en la ausencia de campo magnético. Por el contrario, los materiales ferrimagnéticos y antiferromagnéticos presentan un alineamiento antiparalelo de los momentos magnéticos de sus átomos. En los materiales antiferromagnéticos los momentos son iguales pero opuestos, lo que da lugar a la compensación de los momentos magnéticos, mientras que los materiales ferrimagnéticos los momentos no son iguales o hay más en una dirección que en otra, lo que genera un momento neto (Figura AI.4).

1.4. Superparamagnetismo.

Los materiales ferromagnéticos, ferrimagnéticos o antiferromagnéticos se componen de regiones llamadas dominios magnéticos en los que la dirección de los momentos magnéticos es la misma. Si el tamaño del material es lo suficientemente pequeño puede contener un solo dominio en el que los momentos magnéticos están orientados en la misma dirección, generando un dipolo permanente. Si el tamaño del material es lo suficientemente pequeño o la temperatura es lo suficientemente alta, la energía térmica es suficiente para producir una inversión en la magnetización. Este comportamiento se denomina superparamagnetismo y se caracteriza porque en ausencia de un campo magnético aplicado el momento magnético neto es cero, mientras que cuando se aplica un campo magnético se produce una orientación de los momentos magnéticos generando un momento neto (Figura IA.1). Ésto es similar a lo que ocurre en los materiales paramagnéticos, excepto porque en este caso los momentos no son de átomos individuales, sino de partículas completas (Figura IA.5), siendo la magnitud de la magnetización de estos materiales de orden similar a los materiales ferromagnéticos, del orden de 10^4 veces mayor que la de los materiales paramagnéticos.

Figura AI.5

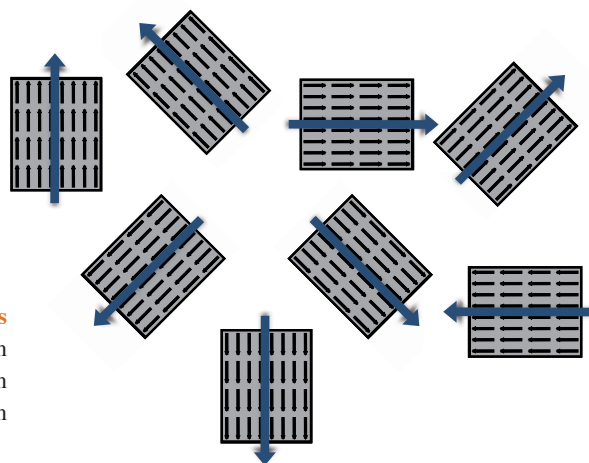


Figura AI.3. Representación esquemática de los momentos magnéticos de un compuesto superparamagnético. En estos materiales, aunque los momentos de cada partícula están ordenados, el momento magnético neto del material es cero en ausencia de campo magnético



Este tipo de comportamiento magnético es esencial para las aplicaciones biomédicas *in vivo* de las nanopartículas. Un momento magnético suficientemente alto es necesario al utilizar nanopartículas magnéticas como agentes de contraste para resonancia magnética, o para poder guiar las nanopartículas mediante la aplicación de gradientes magnéticos externos al utilizarlas como agentes de distribución localizada de fármacos. El comportamiento reversible de los materiales superparamagnéticos frente al campo magnético asegura una menor interacción magnética entre las partículas y, por tanto, una menor agregación,

2. Métodos de síntesis y estabilización de nanopartículas magnéticas.

Para la utilización de nanopartículas en biomedicina es de especial importancia el comportamiento superparamagnético y la estabilidad de las muestras a salinidad y pH fisiológicos para evitar la formación de agregados que podrían producir la embolización de los vasos sanguíneos. Además, para las aplicaciones *in vivo* las partículas deben recubrirse de un material biocompatible durante o después del proceso de síntesis, para evitar reacciones adversas en el organismo al que se administren, y los cambios estructurales o degradación de las propias partículas. Otros aspectos importantes a tener en cuenta según el uso que quiera darse a las nanopartículas son el tamaño y sus propiedades magnéticas (revisado en [Tartaj et al., 2003](#)).

El método de síntesis de la nanopartículas puede determinar las características de éstas, como el tamaño, la forma, la distribución de tamaños en la muestra, la composición de las mismas y por tanto, su comportamiento magnético. Las nanopartículas con fines biomédicos pueden sintetizarse a partir de la precipitación de precursores en solución o en forma de vapor o aerosol.

2.1 Métodos de síntesis en fase líquida.

Estos métodos permiten la preparación de nanopartículas magnéticas pudiendo controlar el tamaño y forma de las mismas. En todo proceso de síntesis en fase líquida el mecanismo de formación comprende dos etapas: nucleación y crecimiento. Para que la muestra de nanopartículas sea monodispersa estas etapas deben estar separadas en el tiempo, y la nucleación debe ser instantánea para que los núcleos se generen al mismo tiempo y tengan un crecimiento similar. En la fase de crecimiento el tamaño de los núcleos aumenta por difusión de los componentes de la solución de síntesis hasta la superficie de las partículas en formación hasta que se alcanza el tamaño crítico, en el que se minimiza la energía superficial de las partículas y el núcleo deja de crecer, ya que es estable ([Figura AI.6a](#); [LaMer y Dinegar, 1950](#)). El tamaño crítico depende del solvente y surfactante que se utilice. Sin embargo se pueden conseguir muestras de partículas monodispersas a partir de múltiples eventos de nucleación prolongando el tiempo más allá de la etapa de crecimiento, lo que disminuye la distribución de tamaños, ya que las partículas más pequeñas, que poseen mayor energía superficial se redisuelven y pasan a formar parte de las



más grandes en un proceso de maduración (Figura AI.6c; Den Ouden y Thompson, 1991). Por último pueden producirse partículas uniformes por agregación de subunidades más pequeñas en lugar del proceso de crecimiento continuo (Figura AI.6b; Morales et al., 1992).

Las nanopartículas utilizadas en este trabajo han sido sintetizadas mediante dos de los métodos en fase líquida más utilizados: coprecipitación y descomposición en medio orgánico.

Figura AI.6

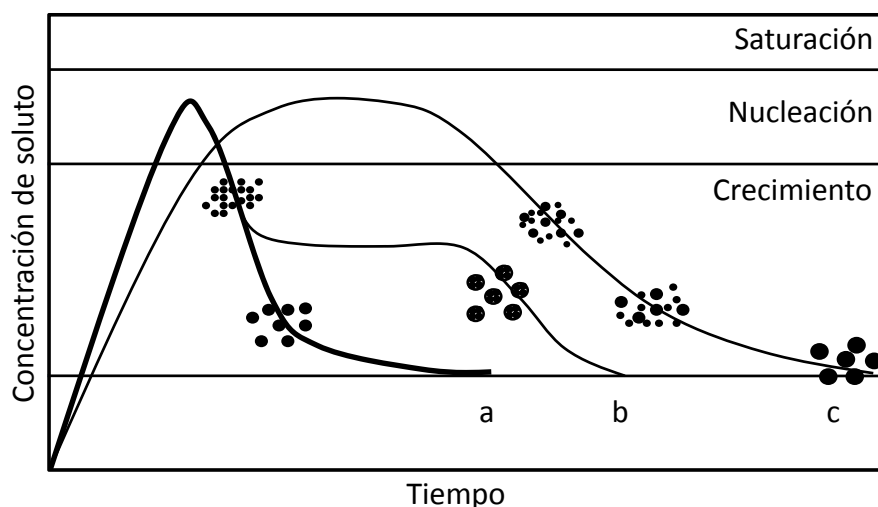


Figura AI.6. Mecanismos de formación de partículas uniformes en solución. a) Nucleación única y crecimiento uniforme por difusión. **b)** Nucleación, crecimiento y agregación de subunidades. **c)** Múltiples eventos de nucleación, crecimiento y maduración.

2.1.1 Coprecipitación.

Para obtener nanopartículas esféricas de magnetita se parte de una mezcla de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ y $\text{Fe}(\text{OH})_3$ en medio acuoso, y se precipita sobre una base (Massart, 1981). El tamaño de las partículas obtenidas puede controlarse variando el pH y la fuerza iónica del medio de precipitación, de forma que el tamaño disminuye a medida que el pH o la fuerza iónica aumentan. Cuando la síntesis se realiza en presencia de determinados compuestos, pueden obtenerse nanopartículas con cubiertas biocompatibles, lo que permite su utilización en biomedicina directamente. En el presente trabajo se han utilizado nanopartículas sintetizadas mediante coprecipitación en presencia de dextrano o aminodextrano.

2.1.2 Descomposición en medio orgánico.

La descomposición de precursores de hierro en la presencia de surfactantes orgánicos a alta temperatura en disolventes orgánicos permite obtener nanopartículas de tamaño homogéneo y alta cristalinidad, y cuyas propiedades magnéticas son especialmente interesantes para su



uso en biomedicina. Las nanopartículas utilizadas en este trabajo se sintetizaron partiendo de acetilacetato de hierro (III) como precursor, ácido oleico y oleilamina como surfactantes y fenil éter como disolvente (método desarrollado en [Sun y Zeng, 2002](#)). En el presente trabajo se han utilizado nanopartículas sintetizadas mediante este método y cubiertas posteriormente de ácido dimercaptosuccínico.

2.2 Métodos de síntesis en fase aerosol/gas.

Estos métodos permiten sintetizar una gran cantidad de nanopartículas de manera continua. Existen dos posibilidades: spray pirólisis, que genera partículas ultrafinas que se agregan formando partículas mayores, o láser pirólisis, que produce una menor agregación debido a que el tiempo de reacción es más corto. Este último es uno de los métodos utilizados para sintetizar alguna de las nanopartículas utilizadas en este trabajo, como las cubiertas de ácido cítrico, ácido fosfonoacético o carboxidextrano.

2.2.1 Láser pirólisis.

Este método consiste en la aplicación del haz de un láser a una mezcla de gases entre las que se encuentra el precursor de hierro ([Cannon et al., 1982](#)). El precursor suele ser $\text{Fe}(\text{CO})_5$, debido a su alta volatilidad. Se utiliza un láser de CO_2 que emite de forma continua a una densidad de energía de 652 Wcm^2 . Debido a que el precursor no adsorbe la radiación de la longitud de onda del láser se utilizan otros gases como adsorbentes y transportadores del vapor de $\text{Fe}(\text{CO})_5$, como el etileno, que no se descompone a esta densidad de energía, sino que la adsorbe aumentando la temperatura del $\text{Fe}(\text{CO})_5$, que se descompone en núcleos de hierro y CO. Para obtener las partículas de óxido de hierro se introduce aire en el sistema, y los núcleos son transportados hasta un filtro colector. Con este método pueden obtenerse nanopartículas de pequeño tamaño, dando lugar a muestras de tamaño homogéneo y escasa agregación.

2.3 Recubrimiento de las nanopartículas, transferencia a medio acuoso y estabilización.

Algunos de los métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas requieren un paso adicional para proporcionarles una cubierta biocompatible. Este paso es especialmente importante en el caso de las nanopartículas sintetizadas mediante descomposición térmica, ya que deben transferirse desde un medio orgánico a medio acuoso y estabilizarse. La cubierta biocompatible puede proporcionarse mediante diversas estrategias como el intercambio de ligandos, la ruptura del doble enlace del ácido oleico, el recubrimiento o encapsulación de las nanopartículas en polímeros o liposomas, o el recubrimiento inorgánico ([Figura AI.7](#)).



El intercambio de ligando permite la sustitución de los surfactantes que tras la síntesis de las nanopartículas están unidos a su superficie, por otros compuestos que son los responsables de estabilizar las nanopartículas en agua fundamentalmente por carga. Estos ligandos deben poseer como mínimo dos grupos funcionales, uno con el que se unen a las nanopartículas y otro con el que estabilizan a las partículas en agua (Figura AI.7).

Figura AI.7

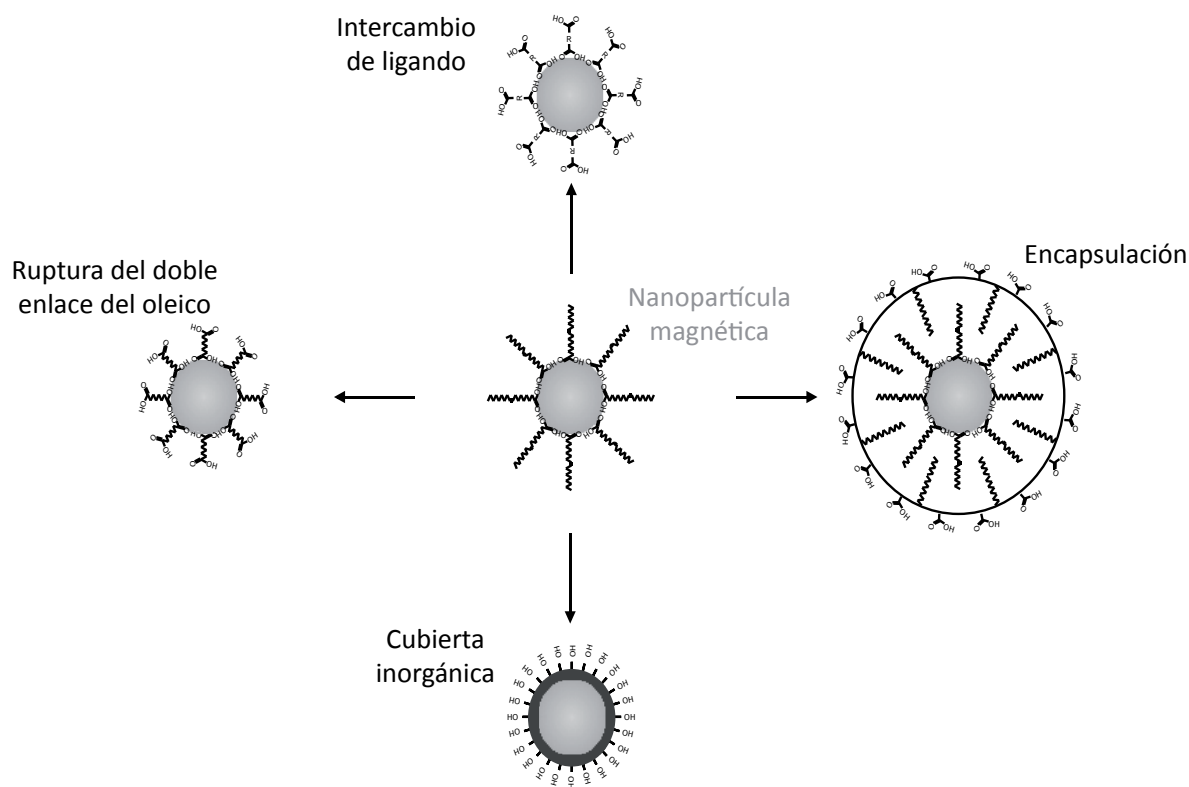


Figura AI.7. Métodos de recubrimiento de las nanopartículas magnéticas.

El método de ruptura del doble enlace del oleico permite que la nanopartícula no esté sin recubrir en ningún momento, ya que la reacción se produce por la oxidación completa del doble enlace en posición 9 del ácido oleico, de forma que la molécula se rompe en dos partes, quedando una de ellas unida a las nanopartículas, mientras que la otra se elimina (Figura AI.7; Herranz et al., 2008).

El recubrimiento de las nanopartículas por polímeros o su encapsulación en liposomas asegura la estabilidad por impedimento estérico, sin embargo la estabilidad depende de la naturaleza del recubrimiento, su peso molecular, la longitud de las cadenas y la relación entre las partes hidrófobas e hidrófilas. Normalmente los polímeros se intercalan entre las cadenas hidrocarbonadas de los surfactantes, o se realiza un intercambio de ligando a alta temperatura utilizando polímeros con un grupo funcional que pueda desplazar al ácido oleico. En el caso de



los liposomas las nanopartículas se dispersan en cloroformo en presencia de fosfolípidos, de forma que se genera un doble capa lipídica. Ajustando la cantidad de partículas, de fosfolípidos y de solvente orgánico se pueden conseguir liposomas que contengan las nanopartículas en el espacio hidrofóbico de la doble capa o en el interior, de forma que los fosfolípidos se intercalan con las cadenas del ácido oleico (Figura AI.7; Soenen et al., 2009).

Otra posibilidad es el recubrimiento inorgánico de las nanopartículas con compuestos inorgánicos inertes como oro o sílice (Figura AI.7), que son biocompatibles y permiten la posterior funcionalización de las nanopartículas a través de grupos tiol o hidroxilo respectivamente (Mandal et al., 2005).

3. Caracterización estructural y coloidal de las nanopartículas magnéticas.

Tras la síntesis, estabilización y funcionalización de las nanopartículas es de especial importancia conocer sus características fisicoquímicas, ya que, como hemos visto, van a tener importantes efectos en su comportamiento magnético, distribución y toxicidad. Las características de las nanopartículas utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla M.1 (Materiales y Métodos). Para determinar estas características se han utilizado varias técnicas básicas:

Figura AI.8

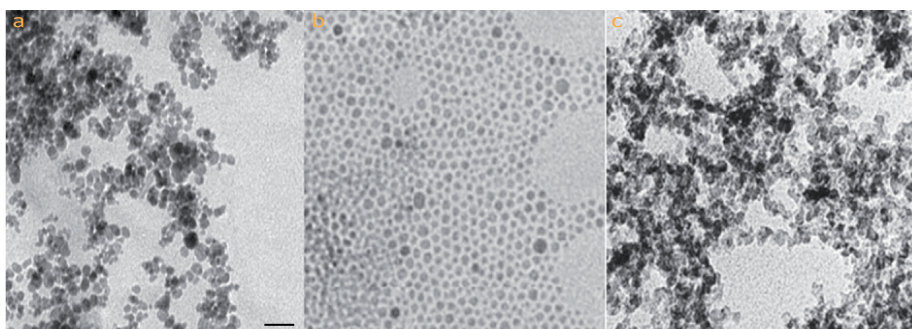


Figura AI.8. Imágenes de TEM de nanopartículas magnéticas utilizadas en este trabajo. Las imágenes muestran nanopartículas magnéticas sintetizadas por coprecipitación (a), descomposición en medio orgánico (b) y láser pirólisis (c). Barra de escala: 100 nm.

3.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Esta técnica permite la caracterización estructural y morfológica de las muestras de nanopartículas mediante la adquisición de imágenes de las mismas (Figura AI.8). A partir de las imágenes se puede calcular el tamaño de las nanopartículas y la distribución de tamaños. Además esta técnica proporciona información sobre la forma y el estado de agregación de las nanopartículas.

Para realizar el análisis del tamaño de las nanopartículas de una muestra se mide el diámetro mayor de al menos 200 partículas. A partir de esos datos se calcula el tamaño medio de partícula



(D_{TEM}) de cada muestra y su grado de polidispersidad (σ), que se calcula dividiendo la media de las desviaciones de los tamaños de las nanopartículas entre el tamaño medio de partícula de la muestra. Para que una muestra se considere monodispersa debe cumplirse que $\sigma < 20\%$.

3.2 Análisis termogravimétrico (ATG).

Mediante el análisis termogravimétrico se caracteriza la cantidad de recubrimiento orgánico presente en las nanopartículas. La técnica se basa en la medida continua de la masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo en que está sometida a una atmósfera reactiva adecuada. Los datos se expresan en % en peso de recubrimiento respecto a la masa total de la partícula.

3.3 Dispersión dinámica de luz (DLS).

Mediante esta técnica se realiza la caracterización coloidal de las suspensiones, es decir, se determina el tamaño de las partículas en solución y la carga superficial de las mismas en función de pH, lo que permite obtener información acerca de las fuerzas que intervienen en la estabilización de los coloides.

3.3.1 Diámetro hidrodinámico.

La medición del diámetro hidrodinámico (D_h) de las nanopartículas se realiza a partir del movimiento browniano (parametrizado en el coeficiente traslacional) de éstas, es decir, a partir del movimiento al azar de las partículas dentro del solvente por efecto del choque con las moléculas del medio que las rodea. El movimiento de las partículas se relaciona con el tamaño hidrodinámico a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_{dif}}$$

D_h es el diámetro hidrodinámico, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad del medio y D_{dif} el coeficiente traslacional de difusión de las partículas.

Al incidir un haz de luz sobre las partículas en suspensión, éstas dispersan la luz en todas direcciones, llegando a un detector en un ángulo determinado. El detector registra las fluctuaciones de la intensidad de luz a lo largo del tiempo, que son debidas al movimiento de las partículas. La comparación de las fluctuaciones a lo largo del tiempo con respecto a la primera señal permite crear una función de correlación. Si las partículas que se están midiendo son de



pequeño tamaño la función de correlación decae rápidamente, debido al rápido movimiento de las partículas. Sin embargo, si las partículas son más grandes la función de correlación decae lentamente.

3.3.2 Carga superficial de las nanopartículas.

La medición de la carga superficial de las partículas se realiza a partir de la medida de la velocidad con la que migran las partículas al aplicar una diferencia de potencial a los electrodos de la célula que contiene la suspensión (movilidad electroforética). En este caso se miden las fluctuaciones de la dispersión de luz por parte de las nanopartículas a un ángulo de 17° y se combina con un haz de referencia. La intensidad de las fluctuaciones de estos haces es directamente proporcional a la velocidad de las partículas. A partir de la obtención de la movilidad electroforética se puede calcular el potencial ζ aplicando la ecuación de Henry:

$$U_e = \frac{2\epsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$

U_e es la movilidad electroforética, ϵ es la constante dieléctrica del medio, ζ es el potencial zeta, η es la viscosidad del medio y $f(ka)$ es la función de Henry, cuyo valor puede aproximarse a 1,5 para partículas de alrededor de 200 nm dispersadas en medios de fuerza iónica superior a 10^{-3} M, o a 1 para partículas más pequeñas.



4. Bibliografía.

Cannon, W.R., Danforth, S.C., Haggerty, J.S., Marra, R.A. (1982). Sinterable ceramic powders from laser-driven reactions. *J Am Ceram Soc* 65, 330-335.

Den Ouden, C.J.J., Thompson, R.W. (1991). Analysis of the formation of monodisperse populations by homogeneous nucleation. *J Colloid and Interface Sci* 143, 77-84.

Herranz F., Morales M.P., Roca A.G., Vilar R., Ruiz-Cabello J. (2008). A new method for the aqueous functionalization of superparamagnetic Fe₂O₃ nanoparticles. *Contrast Media Mol Imaging* 3, 215-222.

LaMer, V.K., Dinegar, R.H. (1950). Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J Am Chem Soc* 72, 4847.

Mandal, M., Kundu, S., Ghosh, S.K., Panigrahi, S., Sau, T.K., Yusuf, S.M., Pal, T. (2005). Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell. *J Colloid Interface Sci* 286, 187-194.

Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans Magn* 17, 1247-1248.

Morales, M.P., González-Carreño, T., Serna, C.J. (1992). The formation of α -Fe₂O₃ Monodispersed particles in solution. *J Mater Res* 7, 2538-2545.

Soenen S.J.H., De Cuyper M. (2009). Assessing Cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging* 4, 207-219.

Sun, S., Zeng, H. (2002). Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J Am Chem Soc* 124, 8204-8205.

Tartaj, P., Morales, M.P., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carreño, T., Serna, C.J. (2003). The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 36, R182-R187.

He disfrutado mucho con esta obra, especialmente en el descanso.

Groucho Marx



Anexo II



Cytokine adsorption/release on uniform magnetic nanoparticles for localized drug delivery

Raquel Mejías^a, Rocío Costo^b, Alejandro G. Roca^b, Cristina F. Arias^a, Sabino Veintemillas-Verdaguer^b,
Teresita González-Carreño^b, María del Puerto Morales^{b,*}, Carlos J. Serna^b,
Santos Mañes^a, Domingo F. Barber^{a,*}

^a Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Darwin, 3, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

^b Department of Particulate Materials, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid/CSIC, Sor Juana Inés de la Cruz 3, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2008

Accepted 31 May 2008

Available online 7 June 2008

Keywords:

Nanoparticle

Drug delivery

Iron oxide

Cytokines

Immunomodulation

Surface modifications

ABSTRACT

Attachment of cytokines to magnetic nanoparticles has been developed as a system for controlled local drug release in cancer therapy. We studied the adsorption/release of murine interferon gamma (IFN- γ) on negatively charged magnetic nanoparticles prepared by three different methods, including coprecipitation, decomposition in organic media, and laser pyrolysis. To facilitate IFN- γ adsorption, magnetic nanoparticles were surface modified by distinct molecules to achieve high negative charge at pH 7, maintaining small aggregate size and stability in biological media. We analyzed carboxylate-based coatings and studied the colloidal properties of the resulting dispersions. Finally, we incubated the magnetic dispersions with IFN- γ and determined optimal conditions for protein adsorption onto the particles, as well as the release capacity at different pH and as a function of time. Particles prepared by decomposition in organic media and further modified with dimercaptosuccinic acid showed the most efficient adsorption/release capacity. IFN- γ adsorbed on these nanoparticles would allow concentration of this protein or other biomolecules at specific sites for treatment of cancer or other diseases.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer immunotherapy is at present an active field of biomedical research given its relevance in the design of new anti-tumor devices. Treatments based on activating an anti-tumor immune response would not only allow removal of the primary tumor, but could also provide sufficient protection to eliminate neoplastic cells that spread to form distal metastases [1,2]. There is considerable recent pre-clinical and clinical evidence showing that manipulation of the innate and adaptive immune responses to neoplastic cells can control development of tumors, leading to their elimination [3–5]. This has led to the concept that immunotherapy might be a central element in the development of anti-cancer therapies, in combination with surgery as well as chemo- and radiotherapy [6].

Studies of the anti-tumor immune response indicate that the T helper type 1 (Th1) lymphocyte-mediated response is much more effective than that mediated by Th2 lymphocytes [7]. Due to their

increased cytotoxic activity, Th1 cells have a greater capacity than Th2 cells to eradicate tumors in murine models [7]. Type Th1 responses are characterized by the production of interferon gamma (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2) and IL-12, whereas IL-4, IL-5 and IL-10 production is typical of Th2 responses. Administration of specific cytokines that promote expansion and/or activation of one type of lymphocyte or another may thus be useful in cancer immunotherapy. Many studies point to IFN- γ as the most effective cytokine in tumor elimination. Injection of IFN- γ -blocking monoclonal antibodies into experimental animals suppresses their ability to reject transplanted tumors [8,9]. Compared to normal mice, 129/SvEv mice deficient in proteins involved in IFN- γ receptor signaling develop primary tumors more frequently, which grow more rapidly at lower carcinogen doses [10]; results were similar for IFN- γ -deficient C57BL/6 mice [11,12]. In models of genetically induced tumor formation (p53^{-/-} mice), lack of IFN- γ or of its signaling pathway proteins further enhances tumor development [10,12]. IFN- γ acts at two levels; first, it promotes the differentiation and expansion of tumor-specific Th1 CD4⁺ T cells and cytolytic T cells (CTL), and also activates macrophages [9]. Secondly, IFN- γ acts directly on tumor cells, increasing their immunogenicity [8].

Local cytokine administration in the vicinity of neoplastic cells improves the immune response to solid tumors [13]. The most commonly used method to increase local cytokine concentration is tumor cell transduction with cDNA encoding a cytokine of interest,

* Corresponding authors. Barber is to be contacted at Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Darwin 3, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 585 5307; fax: +34 91 372 0493. Morales, Department of Particulate Materials, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid/CSIC, Sor Juana Inés de la Cruz 3, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 334 8995; fax: +34 91 372 0623.

E-mail addresses: puerto@icmm.csic.es (M. del Puerto Morales), dfbarber@cnb.csic.es (D.F. Barber).



Liver and brain imaging through dimercaptosuccinic acid-coated iron oxide nanoparticles

Background & aim: Uptake, cytotoxicity and interaction of improved superparamagnetic iron oxide nanoparticles were studied in cells, tissues and organs after single and multiple exposures. **Material & method:** We prepared dimercaptosuccinic acid-coated iron oxide nanoparticles by thermal decomposition in organic medium, resulting in aqueous suspensions with a small hydrodynamic size (< 100 nm), high saturation magnetization and susceptibility, high nuclear magnetic resonance contrast and low cytotoxicity. **Results:** *In vitro* and *in vivo* behavior showed that these nanoparticles are efficient carriers for drug delivery to the liver and brain that can be combined with MRI detection.

KEYWORDS: blood-brain barrier disruption • brain imaging • magnetic nanoparticles • NMR contrast agent • NMR imaging • USPIO iron oxide

Magnetic nanoparticles have the potential to revolutionize current approaches to clinical diagnostic and therapeutic treatment [1–3]. The use of small superparamagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agents in MRI has gained wide acceptance for imaging vascular leakage, macrophages and for cell tracking [4–13]. A therapeutic drug linked to such nanoparticles would allow monitoring of targeted drug delivery and controlled release by the application of an external magnetic field [14]. Currently available commercial contrast agents are poorly taken up by cells; although well-suited for magnetic imaging, they do not permit tissue and intracellular drug delivery [6]. A particularly promising approach is the use of these nanoparticles for the detection and treatment of active lesions in neurodegenerative disease, since nanoparticles are able to cross the blood–brain barrier (BBB) in certain conditions, although with potential risk to health [15].

Intense interest is currently focused on improvement of magnetic nanoparticle design in terms of magnetic core, coating material and functional ligands [7,16]. Commercial products are usually synthesized by coprecipitation and are coated by diverse polymers or molecules. Hydrodynamic size and coating determine nanoparticle biodistribution and targeting of the organ or tissue to be imaged. Dextran- (Feridex®; Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Paris, France) and carboxydextran- (Resovist®; Schering, Berlin, Germany) coated small paramagnetic iron oxide (SPIO) with hydrodynamic sizes of more than 100 nm are used to image the liver [6], whereas ultra small

paramagnetic iron oxide (USPIO) with hydrodynamic sizes less than 50 nm are preferred for angiography and tumor permeability applications [6,17]. Particle and aggregate size reduction nonetheless diminishes the magnetic properties and thus, image contrast. Moreover, magnetically controlled drug targeting and delivery require nanoparticles with high magnetization and the possibility of surface derivatization for drug attachment.

New synthetic methods have been developed in the last 10 years to improve crystallinity by nonhydrolytic thermal decomposition of organic precursors, which allows synthetic control of particle features such as size, magnetic dopants, magneto-crystalline phases and surface chemistry [8,18]. These innovative nanoparticles show superior magnetic properties and MR contrast enhancement effects compared with those of conventional MR contrast agents [7].

Here, we synthesized magnetic nanoparticles by thermal decomposition of iron acetylacetonate in an organic medium [19], which assured formation of uniform, highly crystalline nanoparticles with enhanced magnetic properties, including saturation magnetization values near those measured for the bulk material [20,21]. Water stability was attained by ligand exchange with dimercaptosuccinic acid (DMSA), which provides high stability in aqueous media and free ligand groups for further biomolecule conjugation [22–24]. The attachment of cytokines to DMSA-coated magnetic nanoparticles prepared by this method shows promise as a system for controlled local drug release in cancer therapy [25].

Raquel Mejías²,
Sonia Pérez-Yagüe²,
Alejandro G Roca¹,
Nicolás Pérez³,
Ángeles Villanueva⁴,
Magdalena Cañete⁴,
Santos Mañes²,
Jesús Ruiz-Cabello⁵,
Marina Benito⁶, Amílcar
Labarta³, Xavier Batlle³,
Sabino Veintemillas-
Verdaguer¹,
M Puerto Morales^{1*},
Domingo F Barber²
& Carlos J Serna¹

*Author for correspondence:

¹Instituto de Ciencia de
Materiales de Madrid/CSIC, Sor
Juana Inés de la Cruz 3, Campus
de Cantoblanco, Madrid
28049, Spain

Tel.: +34 913 348 995

Fax: +34 913 720 623

puerto@icmm.csic.es

²Centro Nacional de
Biotecnología/CSIC, Spain

³Universitat de Barcelona, Spain

⁴Universidad Autónoma de
Madrid, Madrid, Spain

⁵Universidad Complutense de
Madrid & CIBER de Enfermedades
Respiratorias, Madrid, Spain

⁶Hospital Gregorio Marañón,
Madrid, Spain

future
medicine part of fsg



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided *in vivo* delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy

Raquel Mejías^a, Sonia Pérez-Yagüe^a, Lucía Gutiérrez^b, Lourdes I. Cabrera^b, Roberto Spada^a, Pilar Acedo^c, Carlos J. Serna^b, Francisco J. Lázaro^d, Ángeles Villanueva^c, María del Puerto Morales^b, Domingo F. Barber^{a,*}

^aCentro Nacional de Biotecnología/CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bInstituto de Ciencia de Materiales de Madrid/CSIC, Sor Juana Inés de la Cruz 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^cDepartamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin 2, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^dDepartamento de Ciencia y Tecnología de Materiales y Fluidos, Universidad de Zaragoza, María de Luna 3, 50018 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2010

Accepted 5 January 2011

Available online xxx

Keywords:

Immunomodulation

Nanoparticle

Carcinogenesis

Cytokine

Magnetism

ABSTRACT

As radio- and chemotherapy-based cancer treatments affect both tumors and healthy tissue, cancer immunotherapy attempts to specifically enhance the natural immune response to tumor cells. In mouse models of cancer, we tested uniform dimercaptosuccinic acid (DMSA)-coated monodisperse magnetic nanoparticles as a delivery system for the anti-tumorigenic cytokine IFN- γ . IFN- γ -adsorbed DMSA-coated magnetic nanoparticles were targeted to the tumor site by application of an external magnetic field. We analyzed nanoparticle biodistribution before and after IFN- γ conjugation, as well as the efficiency of nanoparticle accumulation in tumors, IFN- γ release in the area of interest, and the effects of both on tumor development. At the tumor site, we observed a high degree of nanoparticle accumulation and of cytokine delivery, which led to increased T cell and macrophage infiltration and promoted an anti-angiogenic effect. The combined action led to a notable reduction in tumor size. Our findings indicate that IFN- γ -adsorbed DMSA-coated magnetite nanoparticles can be used as an efficient *in vivo* drug delivery system for tumor immunotherapy.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Surgery-, radiotherapy- and chemotherapy-based cancer treatments affect both tumors and healthy tissue, which has led to the search for new means to fight tumors more specifically. Tumor immunotherapy shows promise as a cancer treatment strategy, as it could enhance the immune system's natural capacity to specifically recognize and eliminate tumor cells [1–3].

The immune response depends on the balance of cytokines produced by two helper T (Th) cell subsets, Th1 and Th2 [4]. The Th1 response, regulated by cytokines such as interleukin-12 (IL-12) and IFN- γ , is much more effective against tumors than the Th2 response [5,6], and is essential for *in vivo* eradication of tumors [7]. In mice, blockade of IFN- γ by monoclonal antibodies suppresses the animal's ability to reject transplanted tumors [8,9]. Mice with deficiencies in IFN- γ or IFN- γ receptor signaling pathways develop tumors more frequently and rapidly at lower carcinogen doses; lack of or insensitivity to IFN- γ enhances development of genetically induced

tumors [10–12]. IFN- γ operates at several levels, by promoting activation and infiltration of tumor-specific T cells and macrophages [8], by increasing the immunogenicity of tumor cells [9], and by inhibiting tumor angiogenesis [13,14]. Modulation of immune responses by administration of cytokines that facilitate a Th1 response, such as IFN- γ , is therefore one of the strategies used in cancer immunotherapy. Problems have nonetheless been encountered in delivering an appropriate cytokine dose at the tumor site without generating toxicity to surrounding tissues [15,16].

Directed IFN- γ targeting to the tumor site could improve the efficiency of its delivery, increasing local dosage without augmenting the systemic concentration, as well as reducing toxicity and other side effects. Nanotechnology provides a means to target drugs magnetically using superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) as drug delivery systems in conjunction with a magnetic field, either applied externally or implanted internally. Nanoparticle-based drug delivery systems are solid colloidal particles in the submicron range (from 1 to several hundred nm), that bear a therapeutic agent covalently attached to/adsorbed onto the particle surface, dissolved/dispersed within a polymer carrier matrix, or encapsulated within a polymer/lipid [17]. Magnetic nanoparticles have the potential to improve current therapies

* Corresponding author. Tel.: +34 915855307; fax: +34 913720493.
E-mail address: dfbarber@cnb.csic.es (D.F. Barber).

Dios te lo pague, amigo, que me has consolado con tus advertimentos y consejos. Y en verdad que lo pienso poner en práctica y pulirme y repulirme...

Miguel de Cervantes



Agradecimientos



La realización de una Tesis es un maravilloso viaje sin parangón. Vuelvo la vista atrás y recuerdo todos y cada uno de los felices días que he pasado inmersa en este bonito proyecto, y no puedo más que dar gracias a todos aquellos que bla, bla, bla... ¿Qué?, os habíais asustado, ¿eh?. Todos los que me conocéis sabéis que esto no puedo hacerlo así, que mi estilo es bastante más informal, lo que no significa que mi agradecimiento sea menos sincero... Sé lo que estáis pensando, y sé que muchos os sentiréis animados. Sí, si alguien como yo (**Figura A.1a**) ha podido llegar hasta el final de la Tesis sin perecer en el intento, cualquiera puede. Pero tengo que admitir que ha sido, además de por mis muchos méritos y las numerosas virtudes que me adornan (no quiero risas), porque he tenido gente cerca que me ha ayudado en todo momento, y porque gracias a todos ellos la verdad es que sí puedo echar la vista atrás y pensar: “Vaya, pues no me lo he pasado tan mal”. Para empezar tengo que dar las gracias a **Domingo Barber** (**Figura A.1b**), mi director de Tesis, por haberme confiado un proyecto tan raro como este y haber creído que lograríamos completarlo, por enseñarme a tener calma (aunque esto no le ha salido muy bien), por ser tan buena persona, por no haberme hecho caso ninguna de las veces que le dije que lo quería dejar y por la infinita paciencia que ha tenido conmigo. Domingo, nunca te echaré en cara que por tu culpa se nos conozca (entre muchos otros epítetos cariñosos ganados a pulso) como “Las Domingas”, ni que tus problemas de memoria a corto, medio e incluso largo plazo, me hayan supuesto algún que otro quebradero de cabeza. A Cristina Murga le estoy muy agradecida por aceptar ser mi tutora, por su interés, y por sus consejos y comentarios.

Hay unos cuantos personajes de cuidado que he tenido la suerte de conocer, y que nadie sabe lo que me alegro de que existan y sean como son:

Kris, viniste a salvarme del aburrimiento, el olvido y las telarañas que me empezaban a cubrir cuando estaba solita en el laboratorio, y me enseñaste a tener la actitud adecuada antes, durante y después de la realización de un experimento. Gracias por esos viajes en metro, analizando *IPs* y *dot blots* (como se ve claramente en esta figura...), eso sí que no tiene precio.

Sonia (**Figura A.1c**), siento todas las horas que te he hecho pasar vigilando ratones dormidos, que aunque es una tarea apasionante, a veces termina cansando. Espero que no me guardes rencor y que entiendas que también has aprendido muchísimas cosas que te serán de gran utilidad en la vida, como pegar imanes de dentista en la espalda de un montón de ratones, ¿quién no querría hacer algo así?. Y hablando en serio, nunca podré agradecerte toda la ayuda y el apoyo, que te quedases aquí y que me entiendas. La verdad es que tu nombre debería ir al lado del mío en este trabajo.

Inma, nunca encontraré a nadie dispuesta a hacer el ridículo en mis videos tan bien como lo has hecho tú. Muchas gracias por ser tan buena influencia para mi en el ámbito científico, y tan



AGRADECIMIENTOS

mala influencia en todos los demás ámbitos de la vida, y por todas las risas que me ayudaron a cargar pilas (excelente, ¿no crees?).

Chiara, los desayunos no hubiesen sido lo mismo sin ti. Gracias por las conversaciones durante los tiempos de incubación, donde tratamos temas tan interesantes como gatos, viajes, gatos, cine, gatos, cocina y gatos.

Jesús, gracias por estar tan loco, por haber hecho soportable y hasta divertido el análisis de muestras en el citómetro y porque algunos de los mejores momentos de estos años te los debo a ti (nunca creí que existiera alguien capaz de emocionarse tanto por encontrarse un alubia pintada), y muchas gracias por tus ilustraciones para este trabajo.

Figura A.1



Figura A.1. Factores íntimamente implicados en la elaboración de este trabajo. El elemento efector (**a**) se encuentra bajo la influencia del factor regulador (**b**), que controla el proceso induciendo la activación de **a**. Una vez activado este factor interacciona con alta afinidad con otros elementos moduladores (**c**, **d**, **g**) que actúan como potenciadores, ayudando a reactivar e intensificar los efectos de **a** cuando este elemento sufre episodios momentáneos de inhibición. El elemento **e** participa en los inicios del proceso, disociándose posteriormente del complejo con el fin de crear copias de sí mismo (**f**).

Tengo que agradecer también al Domingo's Crew al completo, **Roberto “Peperoni”** (Figura A.1d) que fomenta mi paciencia hasta límites que nunca creí posibles (vuelve al infierno), pero que también me hace reír; **Isabela** (Figura A.1e) que finalmente consiguió que ya no desee la extinción de los osos panda; **Teresa** (Figura A.1g) y su Atleti, que nos ameniza con historias que nunca sabemos si son verdad, gracias por los paseos en coche saltando pasos de cebra; **Laura**, siempre es bueno tener un recién llegado al que fastidiar y echar la culpa de todo, sé que te va a ir muy bien, sólo son 4 años, sonríte; y **Vladimir**, bienvenido al maravilloso mundo de las nanopartículas, al final les cogerás cariño, ya verás...

También tengo muy presentes al resto de compañeros de laboratorio, en especial a Ana Franco, que tiene tablitas para casi todo, Esther, María, etc. Y por supuesto no me olvido de las personas que han pasado por aquí y ya no están, Teresita-ita, gracias a Ana Risco por las consultas



veterinarias, Estefanía, Inma P., Javi... Todos ellos me ayudaron de una manera u otra.

Quiero dar las gracias a muchas personas que con su trabajo han hecho más sencillo el mío, a Julio Gutiérrez, a Antonio, Coral, Cathy, al personal del animalario, en especial a Lucio, a la gente de cocinas, a Óscar y Soledad del servicio de Histología, a Lola Aparicio por todos esos artículos y libros que le hicimos buscar, a Mari Carmen y Sara del servicio de Citometría, a toda la gente del almacén, a las personas del servicio de limpieza, de instrumentación y mantenimiento, a Javier de personal, y a Juanjo, de la cafetería, por ponerle alegría a las mañanas. Y a todas las personas del departamento que alguna vez me aconsejaron, me ayudaron, me prestaron reactivos, muchísimas gracias.

He tenido la suerte de participar en un proyecto multidisciplinar en el que están implicadas muchas personas de diversos campos científicos. Todos ellos han hecho un gran esfuerzo y han demostrado una gran paciencia al explicarme distintos aspectos de su trabajo y hacerlos comprensibles para mí. Del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid debo agradecer a Alejandro, Rocío, Sabino, Carlos Serna, Lucía, y muy especialmente a Puerto Morales, por su infinita ayuda y porque siempre ve el lado positivo de las cosas. A Ángeles Villanueva, Magdalena Cañete, Pilar y Maca, del Departamento de Citología de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, les agradezco su interés y ayuda con las tinciones y la microscopía, a Amílcar Labarta y Xavier Batlle, del Departamento de Física Fundamental de la Universidad de Barcelona, la realización de algunas de las medidas de magnetización para el estudio de biodistribución, y a Francisco Lázaro, de la Universidad de Zaragoza, la posibilidad de realizar las medidas de susceptibilidad magnética AC.

Fuera del ámbito científico debo dar las gracias a todos los amigos que en un momento u otro me han apoyado, y muy especialmente a mi familia: a mis tíos Pilar y Juanma, que me acogieron en su casa y siempre han estado pendientes de mí, a mis abuelos, a mi hermano Raúl, a Silvia y a mi sobri “Chopito”, a mi Bicho, y por encima de todo a mis padres, porque siempre han sabido que podría, incluso cuando yo no lo creía, porque siempre me han animado y han estado a mi lado. No hay palabras para agradecerlos lo suficiente.

34 botellas de coca-cola de 2 litros, 4 cajas de ansiolíticos, 28 bolsitas de tila y 12 de poleo, 11 paquetes de donuts (de los grandes), 7 bolsas de patatas fritas, 5 pizzas cuatro quesos y otras 5 barbacoa, 8 kebabs de pollo, 4 boles de arroz con bambú y setas del restaurante chino de la esquina, 1 chino (muerto mientras subía a traerme el arroz hasta el 5º piso sin ascensor donde está mi humilde morada), 15 hamburguesas del McDonald’s (con sus correspondientes paquetes de patatas), varias (no diré cuántas) botellas de bebidas espirituosas diversas, 2 ordenadores, 1 libreta tamaño folio, 5 bolis negros, 3 bolis azules, 1 boli rojo, 1 portaminas y 2 cajas de minas, 8 rotuladores fluorescentes, 7 paquetes de folios (de 500), 14 paquetes de kleenex, 2 botes de gotas para los ojos, 1 paquete de tiritas (para tapar las heridas después de darme cabezazos contra la pared), fueron necesarios para escribir esta tesis...

